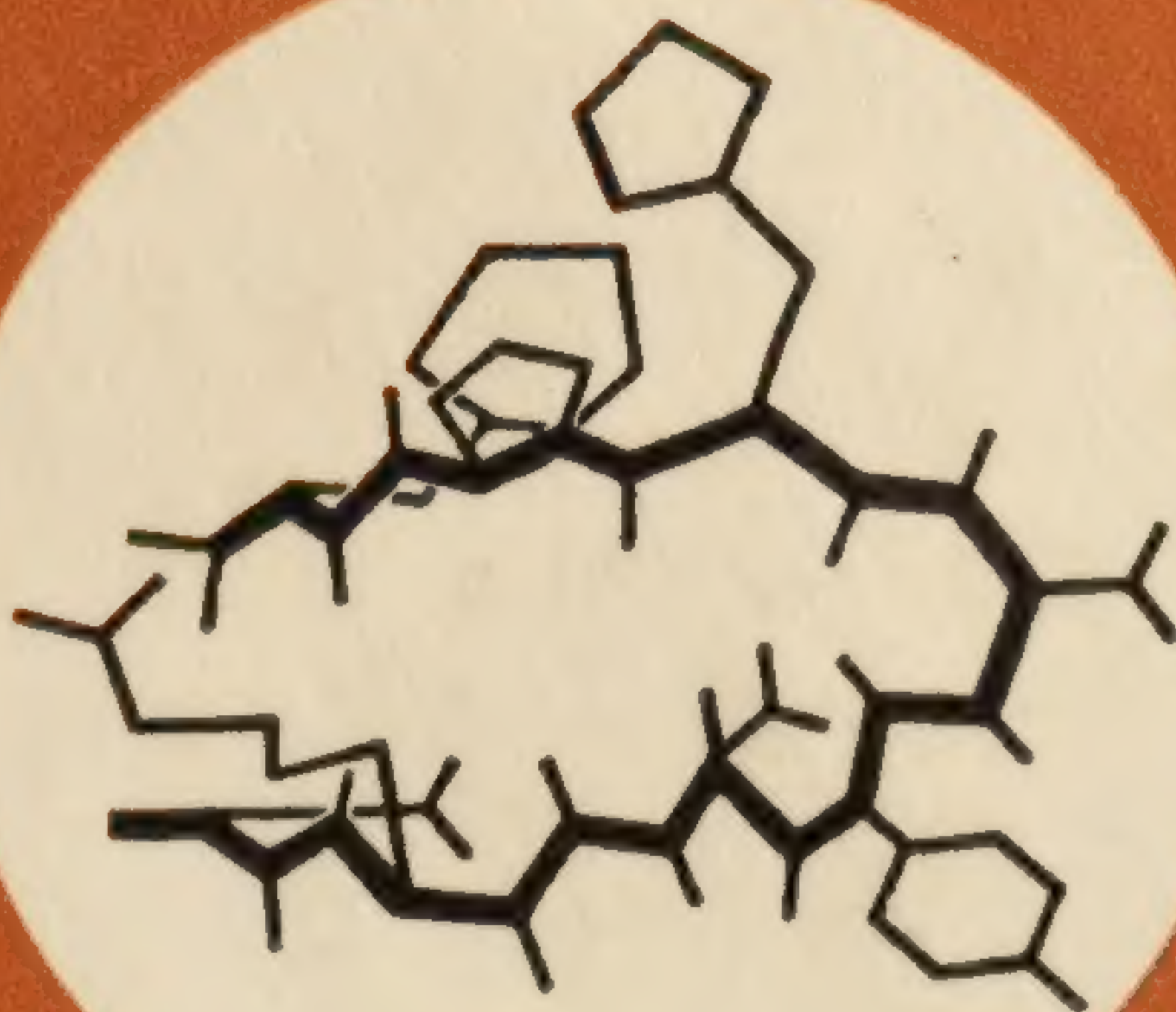


АКАДЕМИЯ НАУК ЛАТВИЙСКОЙ ССР
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОГО СИНТЕЗА

АНГИОТЕНЗИН



АНГИОТЕНЗИН



АНГИОТЕНЗИН

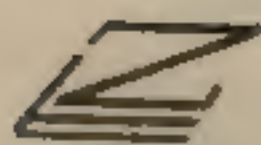
**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ
МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ**

Станислав Геннадьевич Галактионов,
Григорий Валерьянович Никифорович,
Гунар Игнатьевич Чипенс,
Марк Давидович Шендерович

АКАДЕМИЯ НАУК ЛАТВИЙСКОЙ ССР
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОГО СИНТЕЗА

АНГИОТЕНЗИН

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ



РИГА «ЗИНАТНЕ» 1979

АНГИОТЕНЗИН: Молекулярные механизмы действия/
С. Г. Галактионов, Г. В. Никифорович,
Г. И. Чипенс, М. Д. Шендерович. — Рига: Зи-
натне, 1979. — 184 с.

Книга посвящена рассмотрению основных молекуляр-
ных механизмов действия тканевого гормона ангиотензина,
играющего важную роль при регулировании давления
крови в норме и патологии. В первой главе систематизи-
рованы оригинальные результаты авторов, характеризую-
щие спектр стабильных конформаций молекулы ангиотен-
зина, во второй — рассматривается ее взаимодействие с
рецепторными структурами. Материалы этих двух глав ис-
пользуются в третьей главе для анализа структурно-функ-
циональных отношений в ряду аналогов ангиотензина.
Наконец, четвертая глава содержит очерк возможных пу-
тей развития «пострецепторных» этапов реакции гладко-
мышечной клетки на ангиотензин. Табл. 24, ил. 52, библи-
огр. 333 назв.

*Печатается по решению Редакционно-издательского совета
Академии наук Латвийской ССР от 28 июня 1978 года*

ОГЛАВЛЕНИЕ

Основные обозначения

7

Сокращения

9

0. Введение

11

- | | |
|--|----|
| 0.1. Общие сведения о системе ренин—ангиотензин—альдостерон | 12 |
| 0.2. Проблемы изучения структурно-функциональной организации молекулы ангиотензина | 19 |

Глава 1

Конформации молекулы ангиотензина

21

- | | |
|--|----|
| 1.1. Модели пространственной структуры ангиотензина | 22 |
| 1.2. Тотальный теоретический конформационный анализ молекулы ангиотензина | 30 |
| 1.3. Сопоставление экспериментальных и расчетных сведений о структуре ангиотензина | 60 |

Глава 2

Рецепторы ангиотензина

78

- | | |
|--|----|
| 2.1. Специфическое связывание ангиотензина рецепторами клеточных мембран | 79 |
| 2.2. Исследование рецепторов ангиотензина с помощью биологических тестов | 90 |

Глава 3

Структурные аспекты функциональной активности аналогов ангиотензина

110

3.1. Факторы биологической активности аналогов природного гормона	111
3.2. Аналоги ангиотензина с модификацией в положении 1	116
3.3. Аналоги ангиотензина с модификацией в положении 2. Квази-циклизация молекулы ангиотензина как фактор сродства к рецептору	118
3.4. Аналоги ангиотензина с модификациями в положениях 3, 5 и 7	124
3.5. Аналоги ангиотензина с модификациями в положениях 4, 6 и 8	126
3.6. Возможные конформации остова остатков молекулы ангиотензина (по данным биологического тестирования)	128

Глава 4

Развитие сократительной реакции гладкой мускулатуры под действием ангиотензина

134

4.1. Изменение ионного баланса клеток гладких мышц	135
4.2. Электрический потенциал гладкомышечной клетки	145
4.3. Динамика содержания кальция в миоплазме и развитие сократительной реакции	149
4.4. Некоторые эмпирические модели сокращения	157

Список литературы

163

ОСНОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

- b — концентрация агониста в «биофазе»
 B — максимальная концентрация агониста в «биофазе»
 C — концентрация агониста в инкубационной среде
 C_j — концентрация ионов в j -м компартменте
 E — концентрация фермента
 E — энергия ближних внутримолекулярных взаимодействий
 ED_{50} — концентрация агониста, вызывающая эффект, равный половине максимального
 F — свободная энергия
 F — число Фарадея
 G — электрическая проводимость мембраны
 h — постоянная Планка
 J — вицинальная константа
 K — константа равновесия
 k_i, k'_i — прямая и обратная константы скоростей
 k — постоянная Больцмана
 M — концентрация центров связывания кальция на сократительных структурах
 P — прессорная реакция
 P — коэффициент проницаемости
 pA_2 — отрицательный логарифм концентрации антагониста, снижающей эффект агониста в два раза
 $pD_2 = -\lg ED_{50}$
 pK_d — отрицательный логарифм константы равновесия комплекса «агонист—рецептор»
 Q — поверхностная концентрация рецепторов
 R — сопротивление
 R — универсальная газовая постоянная
 S — сигнал

Основные обозначения

T — температура

t — время

U — потенциальная энергия

$$V = \lg \frac{C_{ст}}{C}$$

Y — концентрация «активированных» кальциевых каналов

z — концентрация комплексов «агонист—рецептор»

α — внутренняя активность

δ — химический сдвиг

ε — диэлектрическая постоянная

ζ — концентрация комплексов «антагонист—рецептор»

λ — расстояние между потенциальными барьерами

ρ — реакция

Υ — поверхность клетки

Φ — поток ионов

Ψ — электрический потенциал

φ, ψ, χ — углы внутреннего вращения

ω_i — заряд иона

СОКРАЩЕНИЯ

Abu	— α -аминомасляная кислота	Glu	— глутаминовая кислота
Ac	— ацетил	γ -Glu	— γ -глутаминовая кислота
Acpc	— циклопентан 1-амино, 1-карбоновая кислота (циклолейцин)	Gly	— глицин
Aev	— α -амино- β -этилвалерьяновая кислота	Me ₂ Gly	— диметилглицин
Aht	— аза- α' -гомотирозин	His	— гистидин
Aib	— α -аминоизомасляная кислота (α -метилаланин)	Hyd	— гидантоиновая кислота
Ala	— аланин	Hyp	— 3-оксипролин
β -Ala	— β -аланин	Ile	— изолейцин
N-Me-Ala	— N-метилаланин	α -Ile	— алло-изолейцин
Amb	— <i>p</i> -аминометилбензойная кислота	Leu	— лейцин
Apb	— 3-амино-4-фенилмасляная кислота	Lys	— лизин
Arg	— аргинин	Me	— метил
Arg(NO ₂)	— нитроаргинин	Met	— метионин
Asn	— аспарагин	Nle	— норлейцин
Asp	— аспарагиновая кислота	Nva	— норвалин
β -Asp	— β -аспарагиновая кислота	Orn	— орнитин
Bet	— бетаин глицина	Phe	— фенилаланин
Me ₂ But	— диметил- α -аминомасляная кислота	Pip	— пипеколиновая кислота
Bz	— бензойная кислота	Pr	— пропионовая кислота
Cha	— циклогексилаланин	Pro	— пролин
Chg	— циклогексилглицин	Pyg	— пироглутаминовая кислота
Cit	— цитруллин	Pza	— β -(пиразолил-3)-аланин
Cpg	— циклопентилглицин	Sar	— саркозин
Et	— этил	Ser	— серин
Gln	— глутамин	Suc	— янтарная кислота
		Sup	— β -амид янтарной кислоты
		Tal	— β -2-тиенилаланин
		Thr	— треонин
		Trp	— триптофан
		Tyr	— тирозин
		Val	— валин

Настоящая книга
менных представлений
гипотеза II. Разум
вопросы, касающиеся
им реакций клетки.
рассмотрение всегда
происходящих на мол

Подобное огранич
циального оправдани
проблемам исследова
стерон составляет е
величины соответству
ных дисциплин, как
дающих традиционн
зированных журнало

Разумеется, колич
детельствует о масш
ления о молекулярн
весьма далеки от яс
элементами. Тем не
точно представите
некоторые обобщен
идейные аспекты пр
подробности, а такж
вило, не обсуждают

0. ВВЕДЕНИЕ

Настоящая книга задумана как синтетический очерк современных представлений о молекулярных основах действия ангиотензина II. Разумеется, мы не могли полностью игнорировать вопросы, касающиеся развития «высших» звеньев вызываемых им реакций клетки, ткани или целого организма, однако их рассмотрение всегда подчинено нуждам анализа процессов, происходящих на молекулярно-мембранном уровне.

Подобное ограничение круга интересов вряд ли требует специального оправдания. Число новых публикаций по различным проблемам исследования системы ренин—ангиотензин—альдостерон составляет ежегодно несколько сотен, что по порядку величины соответствует уровню таких вполне автономных научных дисциплин, как квантовая химия или палеонтология, обладающих традиционными научными школами и сетью специализированных журналов.

Разумеется, количество публикаций само по себе еще не свидетельствует о масштабах достигнутых успехов: наши представления о молекулярных основах действия ангиотензина все еще весьма далеки от ясности, часто перегружены гипотетическими элементами. Тем не менее объем накопленных результатов достаточно представителен для того, чтобы оказались возможными некоторые обобщения. Нас будут интересовать исключительно идейные аспекты проблемы; методические и экспериментальные подробности, а также малоинформативные результаты, как правило, не обсуждаются.

0.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О СИСТЕМЕ РЕНИН—АНГИОТЕНЗИН—АЛЬДОСТЕРОН

Основной функцией системы ренин—ангиотензин—альдостерон является регуляция обмена воды и солей у млекопитающих, осуществляемая посредством изменения общего кровяного давления в организме и биосинтеза некоторых стероидных гормонов, главным образом альдостерона [6, 23, 227—229, 240, 313, 318].

Центральным объектом управления оказываются почки. Почки содержат около двух миллионов нефронов — функциональных единиц, в которых происходит фильтрация крови и образование мочи. Каждый нефрон начинается небольшой капсулой, внутри которой находится клубочек кровеносных капилляров (рис. 0.1). В стенке приводящей артериолы у места ее вхождения в клубочек имеется утолщение, образованное миоэпителиальными клетками, — так называемый юкстагломеру-

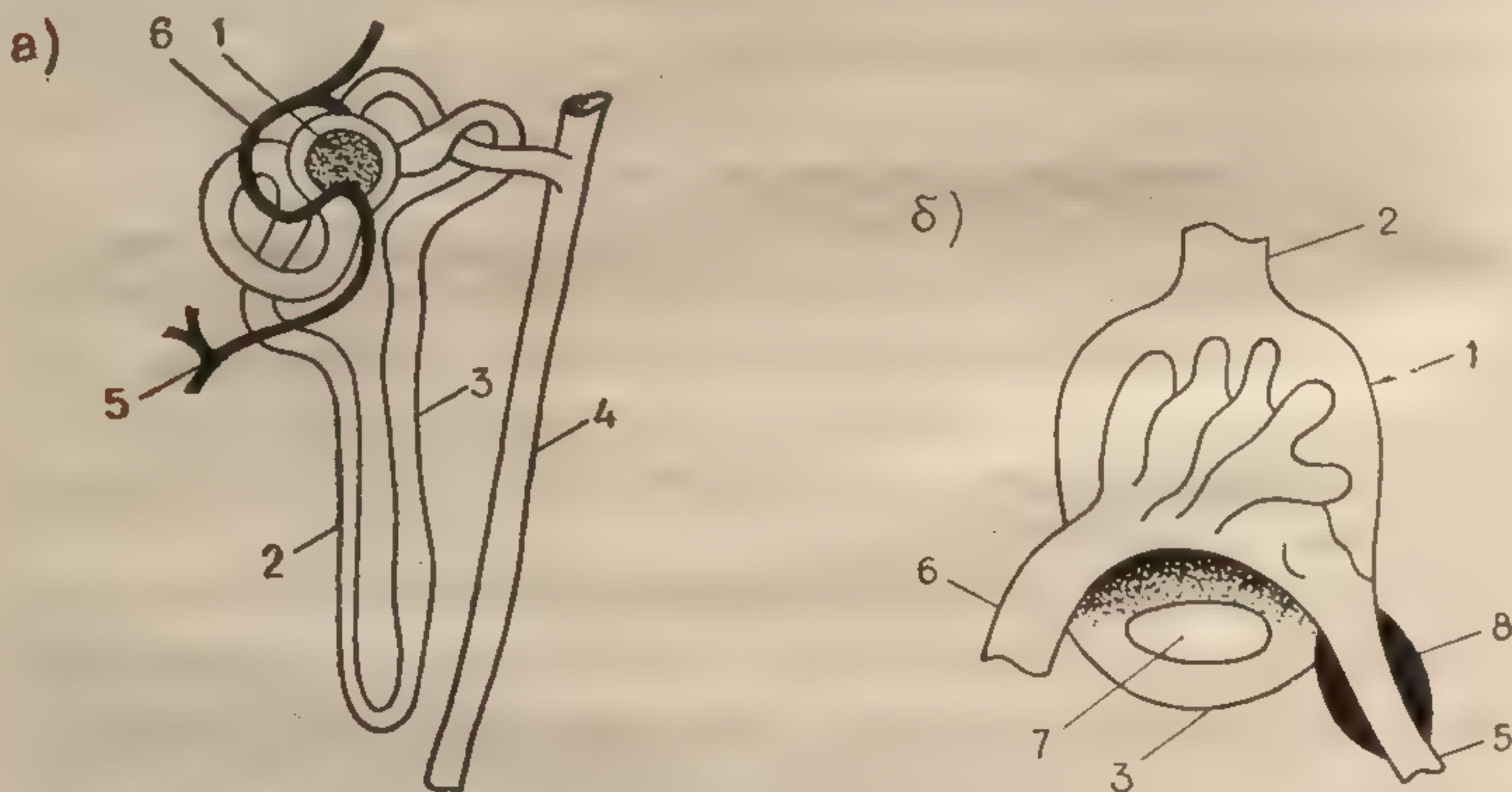


Рис. 0.1. Локализация юкстагломерулярных клеток в нефронах.
а — общая схема строения нефрона; б — схема строения юкстагломерулярного аппарата (поперечный срез).
1 — капсула почечного тельца; 2 — проксимальная часть петли Генле; 3 — дистальная часть петли Генле; 4 — собирательная трубка; 5 — афферентная (приносящая) артериола; 6 — эфферентная (уносящая) артериола; 7 — плотное тело (*macula densa*); 8 — юкстагломерулярные клетки, продуцирующие ренин.

лярный комплекс. Первичная моча, которая образуется в капсулах, является, по существу, плазмой крови, лишенной белков. Проходя впоследствии различные участки петли Генле, она концентрируется: происходит реадсорбция воды, глюкозы, аминокислот, витаминов и т. п., а также части минеральных солей. Особо необходимо отметить своеобразное строение дистальной части петли Генле в районе, где она прилегает к афферентной артериоле. В стенке канальца в этом месте наблюдается скопление большого количества ядер. Этот участок получил название плотного пятна (*macula densa*). Здесь локализованы рецепторы — элементы системы обратной связи, контролирующей содержание и концентрацию ионов в плазме.

Роль системы ренин—ангиотензин—альдостерон в обеспечении водно-солевого гомеостаза организма схематически может быть представлена следующим образом. В ответ на некоторые стимулы (понижение «эффективного» объема крови, падение артериального давления, понижение концентрации натрия в *macula densa* и др.) юктагломерулярные клетки почек выделяют в кровяное русло фермент ренин, который действует на ангиотензиноген — белок α_2 -глобулиновой фракции плазмы крови, отщепляя от него декапептид — проангиотензин, или ангиотензин I (АТ-I). Проангиотензин гидролизуется так называемым конвертирующим ферментом, который отщепляет С-концевой дипептид гистидил-лейцин с образованием высокоактивного октапептида ангиотензина (ангиотензин II (АТ-II), рис. 0.2).

Процесс образования ангиотензина II совершается главным образом во время циркуляции крови через легкие, т. е. в малом круге кровообращения, так как именно здесь локализована

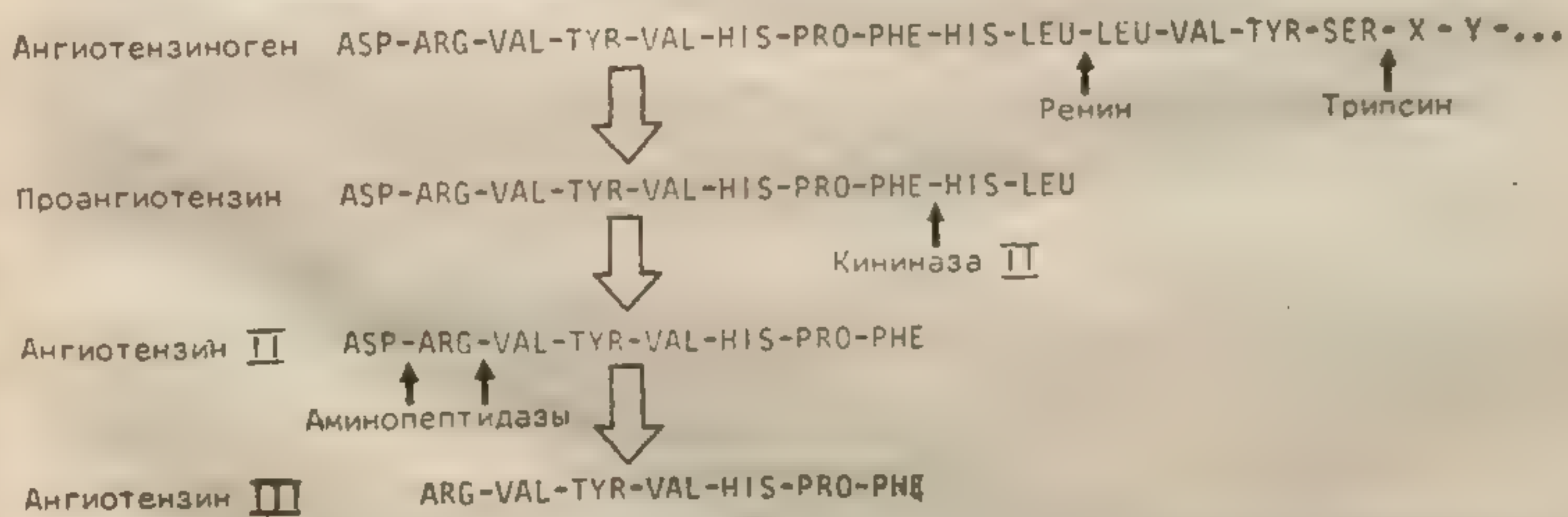


Рис. 0.2. Метаболизм ангиотензина. Черными стрелками показано место действия ферментов.

основная часть конвертирующего фермента [46]. Конвертирующий фермент выполняет в организме еще и другую важную функцию: участвует в деградации брадикинина; поэтому он известен также под названием кининаза II.

Исследованиями последних лет показано, что отщепление N-концевого аминокислотного остатка — аспарагиновой кислоты аминопептидазами на различных стадиях образования ангиотензинов (рис. 0.3) может привести к образованию биологически активного гептапептида — ангиотензина III (АТ-III), который также является эффективным биорегулятором [149], индуцирующим, в частности, секрецию альдостерона [167]. Однако для того чтобы окончательно приписать ангиотензину III функции природного биорегулятора, следует, по-видимому, провести дополнительные исследования, связанные с изучением баланса ангиотензина II и ангиотензина III в плазме крови в норме и патологии, а также детально исследовать образование ангиотензинов в корковом слое надпочечников и печени. Тем не менее целый ряд косвенных экспериментальных данных говорит в пользу этого предположения: так, например, рецепторы ангиотензина, расположенные на клетках коркового слоя надпочечника, показывают более высокое сродство к АТ-III, чем к АТ-II. В этой же системе некоторые аналоги АТ-III являются более сильными антагонистами АТ-II и АТ-III, чем соответствующие аналоги октапептида ангиотензина [143].

В очистке и изучении ренина в последние годы достигнут значительный прогресс [224]. Ренин из свиных почек выделен

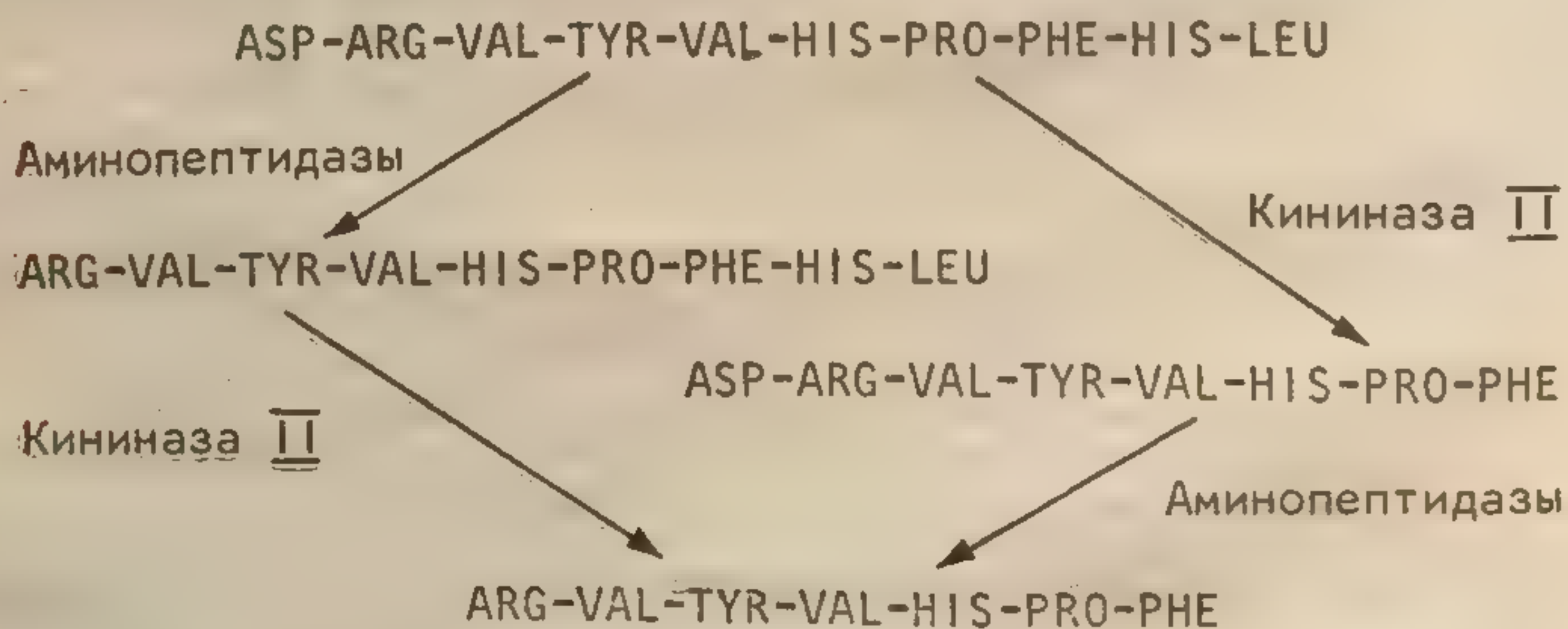


Рис. 0.3. Возможные пути образования ангиотензина III в организме.

с выходом около 25% и с высокой степенью очистки — около 180 тыс. раз. Установление первичной структуры ренина, по-видимому, является вопросом ближайшего будущего. В организме человека обнаружено несколько высокомолекулярных предшественников ренина, а также несколько различных его форм, различающихся по ферментативной активности, что значительно затрудняет получение однородного препарата. Молекулярная масса этих форм оценивается величиной 39 500 Д. Как ренин, так и ангиотензин обладают известной видовой специфичностью. Например, ангиотензиноген, выделенный из плазмы крови овцы, имеет молекулярную массу около 52 000 Д [252]; молекула ангиотензиногена человека примерно в 2 раза крупнее овечьего (молекулярная масса около 110 000 Д [251]).

Обработкой ангиотензиногена лошади трипсином выделен тетрадекапептид — ТДП [197], фрагмент субстрата ренина. Его первичная структура показана на рис. 0.2. Этот пептид — весьма удобный модельный субстрат для изучения процесса образования ангиотензина II. Полагают, что С-концевая аминокислота ТДП (серин) образует сложноэфирную связь с карбонильной группой остатков аргинина или лизина, расположенных у N-конца молекулы ангиотензиногена. Полная структура ангиотензиногена не установлена; по-видимому, его макромолекулярная часть обеспечивает защиту ТДП от неспецифического расщепления ангиотенгиназами плазмы и рениноподобными ферментами.

Ангиотензинпревращающий (конвертирующий) фермент (кининаза II) по своей химической природе является гликопротеидом. Фермент относительно прочно связан с клеточными мембранами: его удается выделить лишь в частично очищенном виде [142]. Характер специфичности этого фермента иллюстрирует рис. 0.4. Кининаза II атакует пептидную связь между аминокислотными остатками 1 и 2, причем ■ этих положениях мо-

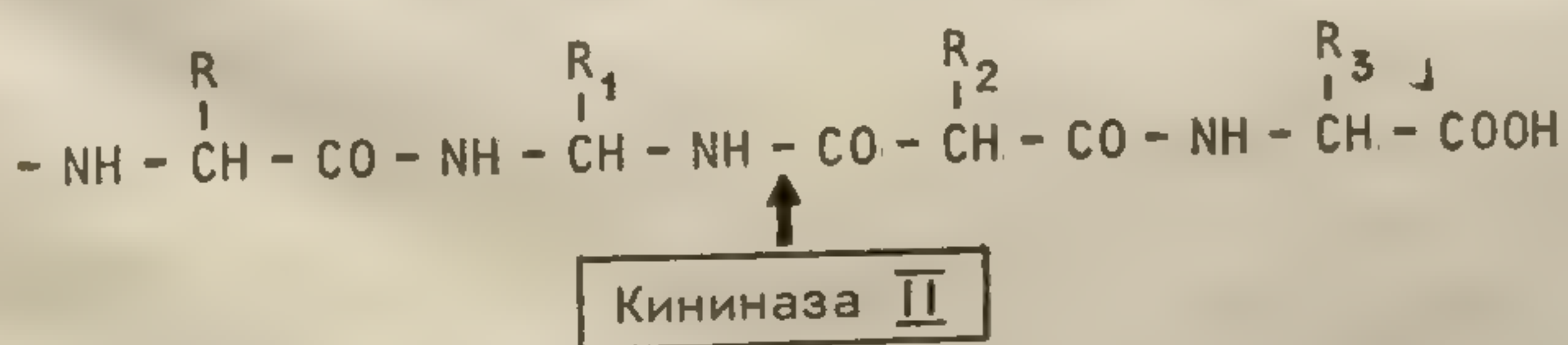
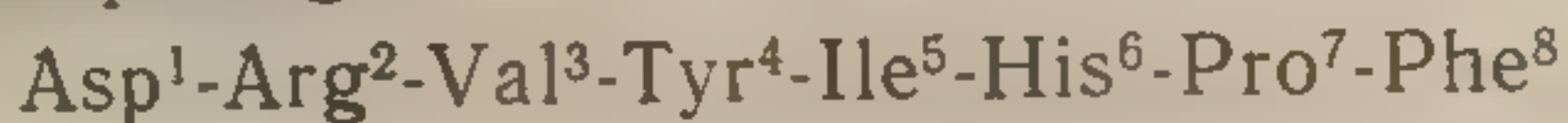
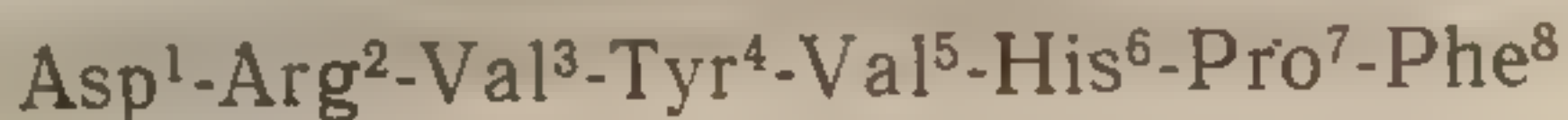


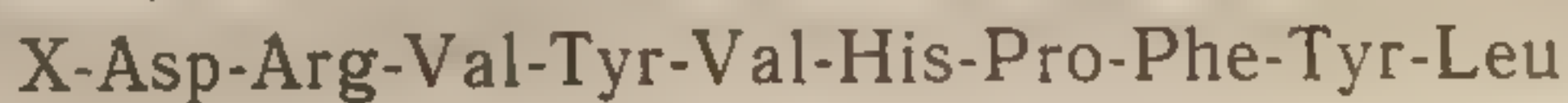
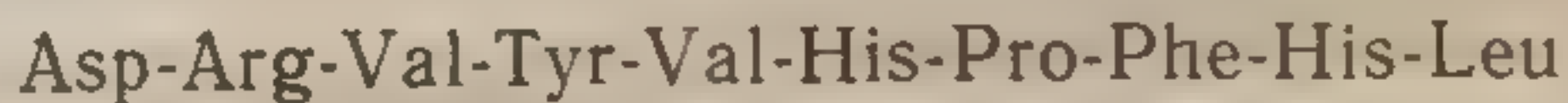
Рис. 0.4. Общая структура субстратов конвертирующего фермента (кининаза II).

гут находиться любые остатки природных аминокислот, за исключением пролина; положение 3 должна занимать аминокислота со свободной карбоксильной группой, но не дикарбоновая аминокислота. Кининаза II содержится как в легких, так и в других тканях. В малом круге кровообращения в легких образуется 30—50% ангиотензина; остальное количество ангиотензина генерируется в периферических кровеносных сосудах [141, 142].

В настоящее время выделено два типа ангиотензинов, различающихся аминокислотной последовательностью: ангиотензин II, выделенный из плазмы крови быка, с аминокислотным остатком валина в пятом положении, и ангиотензин II, выделенный из плазмы лошади или свиньи, содержащий в пятом положении изолейцин:



Выделены также ангиотензин F из крови петухов [220] и ангиотензин S [221] из змей *Elaphe climocophora*, имеющие следующее строение:



Структуры этих ангиотензинов различаются лишь С-концевым дипептидом, отщепляемым кининазой II; следовательно, можно говорить об определенном консерватизме структуры ангиотензина II.

Ангиотензин II обладает широким спектром биологического действия [6, 23, 52, 227—229, 240, 313, 318]. Наиболее существенное влияние он оказывает: 1) на периферические артериолы, поддерживая артериальное давление; 2) на корковый слой надпочечников, стимулируя синтез и освобождение альдостерона; 3) на почечные артериолы и юктагломерулярный аппарат почек, изменяя гемодинамику и секрецию ренина.

Что касается проангиотензина, то выраженной биологической активностью он не обладает, однако в биологических тест-системах всегда присутствует некоторое количество кининазы II, вызывающей его расщепление с высвобождением ангиотензина.

Наиболее хорошо изучено действие ангиотензина на гладкую мускулатуру сосудов и тканей, обуславливающее важные вторичные эффекты — повышение кровяного давления и изменение кровообращения. Изменение кровообращения в почках, в свою очередь, влияет на диурез и выделение электролитов. Ангиотензин вызывает сокращение гладкой мускулатуры (кровеносные сосуды, матка, кишечник, мочевой и желчный пузырь и др.) уже в концентрациях 10^{-8} — 10^{-9} г/мл. Одним из наиболее чувствительных объектов является изолированная матка крысы (пороговая доза 10^{-10} г/мл). Обычным лабораторным тестом определения активности ангиотензина служит уровень повышения кровяного давления у анестезированных крыс. Пороговая доза ангиотензина в этом тесте составляет примерно 0,01 мкг/кг. Линейная зависимость между дозой препарата и величиной ответа сохраняется вплоть до 10 мкг/кг [52]. Для измерения активности ангиотензина в свое время были предложены специальные системы единиц — Гольдблата [163] и Грина—Бампаса [169], однако в настоящее время для любого препарата или аналога ангиотензина оценивается лишь относительная активность (в процентах) по сравнению со стандартом — синтетическим [1-аспарагиновая кислота, 5-валин]-ангиотензином.

Одной из наиболее важных функций системы ренин—ангиотензин—альдостерон является регуляция натриевого баланса, которая осуществляется действием ангиотензина непосредственно на почки, а также через включение минералокортикоидной системы (прежде всего альдостерон). Альдостерон, синтез которого непосредственно индуцируется ангиотензином, вызывает переход натрия из клеток в тканевую жидкость, что приводит к увеличению его концентрации. Вследствие этого увеличивается количество плазмы крови, повышается кровяное давление, возрастает объем клубочковой фильтрации. Наоборот, пониженная секреция альдостерона приводит к увеличению содержания электролитов в клетках, что вызывает переход воды из межклеточной среды внутрь клеток и падение кровяного давления. Необходимо отметить, что ангиотензин высвобождает из мозгового вещества надпочечников также адреналин, усиливая таким образом свой прессорный эффект (рис. 0.5).

В последние годы интенсивно изучается взаимодействие системы ренин—ангиотензин и центральной нервной системы. Одним из элементов регуляции секреции ренина является симпатическая нервная система. Возбуждающее действие симпатичес-

ких нервов в почках опосредуется β -адренергическими рецепторами, расположенными в юстагломерулярном аппарате. Стимулирование соответствующих областей мозга (*medula oblongata*, гипоталамус, участки среднего мозга и др.) увеличивает секрецию ренина. Кроме того, ц.н.с. имеет свою собственную, независимую от почек систему ренин—ангиотензин, функции которой еще не установлены [157, 289]. Полагают, что в ц.н.с. образование ангиотензина служит сигналом жажды. Установлено, что введение ангиотензина непосредственно в спинномозговую жидкость вызывает: 1) появление сильной жажды, 2) повышение кровяного давления, 3) увеличение секреции вазопрессина и 4) увеличение секреции АКТГ. Эти же эффекты вызывает инъекция ренина в вентрикулы мозга.

Этот весьма лаконичный перечень иллюстрирует роль системы ренин—ангиотензин—альдостерон в регулировании водно-солевого равновесия и гемодинамики организма. Более полная информация о системе ренин—ангиотензин—альдостерон содержится в монографии [65].

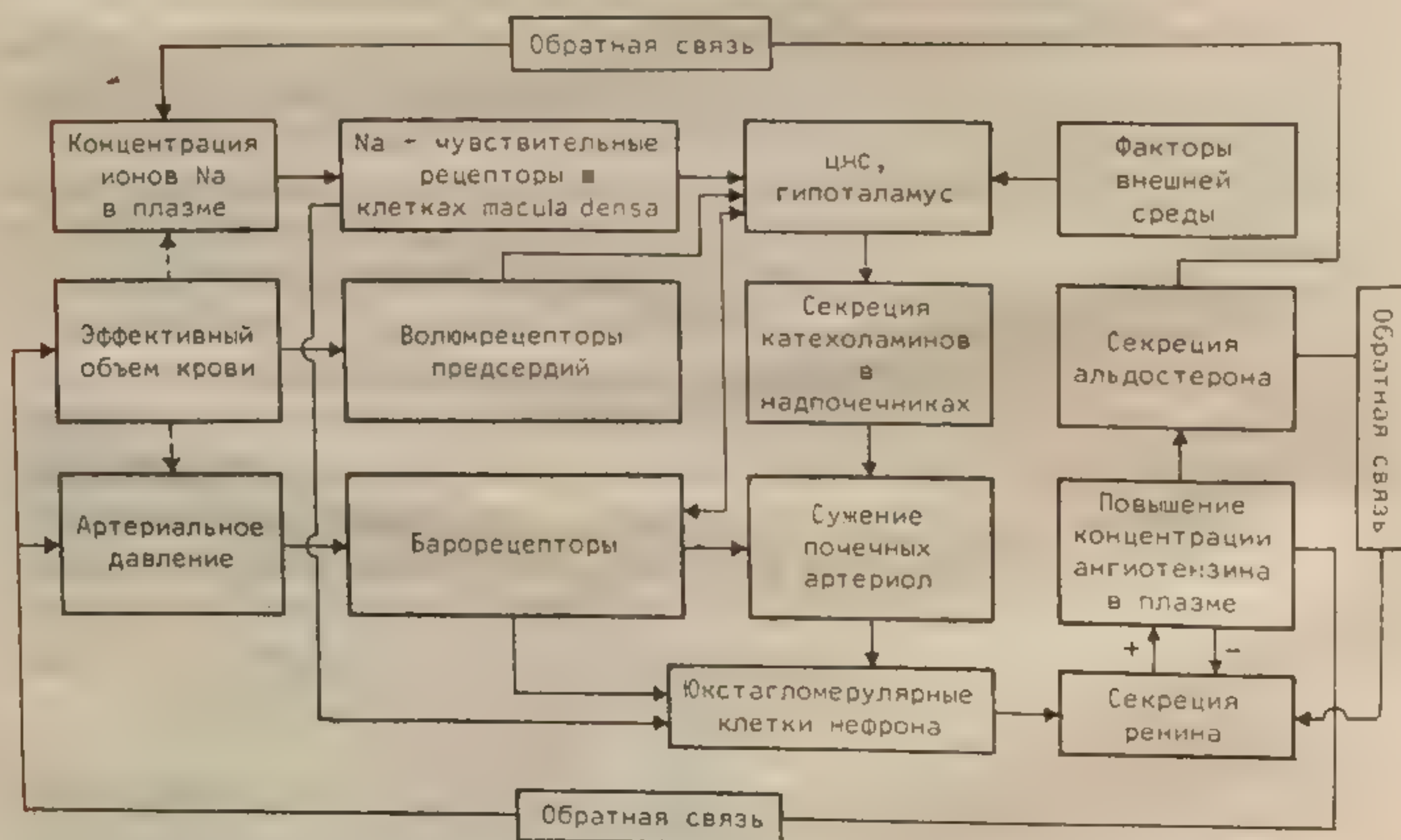


Рис. 0.5. Схема регуляции системы ренин—ангиотензин—альдостерон.

0.2. ПРОБЛЕМЫ ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МОЛЕКУЛЫ АНГИОТЕНЗИНА

Хотя первые данные о существовании системы ренин—ангиотензин были получены еще в конце XIX в., однако лишь в середине 50-х гг. нашего столетия Скеггс [59] и его сотрудники получили высокоочищенные препараты проангиотензина и ангиотензина из плазмы лошади и установили их аминокислотный состав.

Первичная структура ангиотензина и проангиотензина, выделенных из плазмы крови лошади и быка, была установлена в 1956 г. [138, 310]. Годом позже две группы ученых в Швейцарии и США почти одновременно и независимо друг от друга сообщили о синтезе [5-Ile]-ангиотензина [92, 130]. В 1957 г. был синтезирован также [1-Asn, 5-Val]-ангиотензин [325]. Синтезированные препараты еще не обладали полной биологической активностью природного гормона, так как в процессе синтеза не удавалось предотвращать частичную рацемизацию. Однако уже в 1961 г. Аракава и Бампас синтезировали ангиотензин, по активности и спектру действия неотличимый от природного гормона [78]. Проангиотензин с валином в положении 5 был синтезирован Швицером в 1958 г. [305].

Успехи химиков-синтетиков послужили толчком к интенсивному исследованию структурно-функциональных отношений в ряду аналогов ангиотензина. Как известно, отдельные функциональные группы, входящие в состав молекулы природного биорегулятора, в неодинаковой степени участвуют в реализации функционального акта. Некоторые из них вносят основной вклад, образуя так называемый активный центр, другие выполняют лишь поддерживающую функцию либо вообще не принимают в нем участия [49, 297].

Определенная функциональная роль принадлежит также элементам структуры, не связанным жестким образом с какой-либо определенной группой; это прежде всего относится к фиксации взаимного расположения отдельных частей молекулы в пространстве. Анализ структурно-функциональной организации молекулы биорегулятора предполагает выявление подобных закономерностей.

Помимо этого можно говорить о существовании определенной пространственно-временной организации взаимодействия гормона и рецептора, так как вполне вероятно, что отдельные

группировки включаются во взаимодействие не одновременно, а в определенной последовательности.

Изучение структурно-функциональной организации молекул и пространственно-временной организации процесса их взаимодействия с рецепторами является необходимой предпосылкой для понимания механизма действия природных биорегуляторов на молекулярном уровне.

Установление структурно-функциональной организации гормонов имеет большое значение также для целенаправленного создания новых лекарственных препаратов на базе природных биорегуляторов. Например, если из молекулы гормона удастся селективно элиминировать группировки, участвующие в активации рецептора, сохраняя те, которые обеспечивают специфическое комплексообразование, может быть получен антагонист природного гормона, пригодный для разнообразных диагностических и терапевтических целей.

Таким образом, мощным инструментом исследования структурно-функциональных отношений оказывается синтез аналогов природного гормона и соотнесение типа структурной модификации с характером сдвигов биологической активности. Ангиотензин представляет собой чрезвычайно удобный объект для анализа такого рода, занимая среди пептидных гормонов одно из первых мест по числу синтезированных аналогов. Именно вопросы структурно-молекулярной организации молекулы ангиотензина являются одним из основных объектов анализа в настоящей работе.

Анализ ф
щих биолог
быть в насто
как это уда
ных биорегу
[2]; тем не
вия гормона
о пространст
лись неодно
зину [196, 20

Предпола
требует нали
фактора, ко
ственной ст
молекулы би
кулам белки
конформаци
ретических д
пептида в
стабильности
шения цикл
кой «конфор
наличием н
меров можн
формационн
створителя,
формы КД
в...

Глава



КОНФОРМАЦИИ МОЛЕКУЛЫ АНГИОТЕНЗИНА

Анализ факторов пространственной структуры, определяющих биологическую активность пептидных гормонов, не может быть в настоящее время выполнен столь однозначным образом, как это удалось сделать в случае некоторых низкомолекулярных биорегуляторов, например гамма-аминомасляной кислоты [2]; тем не менее попытки осмыслить механизм взаимодействия гормона с рецептором на основе некоторых представлений о пространственном строении молекулы гормона предпринимались неоднократно, в том числе и применительно к ангиотензину [196, 262].

Предполагается, что реализация такого взаимодействия требует наличия определенной пространственной структуры эффектора, которая в известной мере комплементарна пространственной структуре рецептора. Это не означает, однако, что молекулы биологически активных олигопептидов, подобно молекулам белков, обладают в растворе лишь одной, уникальной конформацией. Напротив, целый ряд экспериментальных и теоретических данных свидетельствует о том, что молекула олигопептида в растворе обладает целым набором сравнимых по стабильности конформеров, причем это справедливо даже в отношении циклических пептидов, обладающих сравнительно высокой «конформационной жесткостью» [230]. В частности, именно наличием набора практически одинаково стабильных конформеров можно объяснить, например, изменение усредненных конформационных характеристик молекул пептидов при смене растворителя, которая сопровождается, как правило, изменением формы КД-спектров молекулы [230], или повышение значения времен спин-решеточной релаксации отдельных частей молекулы [105, 329].

Таким образом, современные представления об эффектор-рецепторном взаимодействии предполагают, с одной стороны, вполне определенную пространственную структуру пептидного эффектора в составе гормон-рецепторного комплекса, а с другой — возможность существования в растворе нескольких почти равных по стабильности конформеров. В связи с этим возникли гипотезы о существовании в числе стабильных структур молекулы в растворе так называемой «биологически активной» конформации [140, 206, 323], характерной для процесса связывания молекулы с рецептором, либо о наличии в составе молекулы «конформационно жестких» участков [16, 301], которые ответственны главным образом за связывание с рецептором. Однако важно подчеркнуть, что в любом случае исследование молекулярных механизмов процесса гормон-рецепторного взаимодействия невозможно без детальных сведений о полном спектре конформеров молекулы пептидного эффектора, представленных в растворе. Поэтому корректная постановка задачи определения пространственной структуры олигопептида должна формулироваться как выявление и описание каждого из конформеров, образующих набор стабильных конформаций молекулы.

1.1. МОДЕЛИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ АНГИОТЕНЗИНА

Современное состояние интерпретационных возможностей физико-химических методов исследования пространственной структуры низкомолекулярных пептидных гормонов в растворе не позволяет осуществить решение прямой задачи — определения конформации молекулы по данным экспериментальных измерений. Возможности получения вполне надежной информации такого рода методами рентгеноструктурного анализа также ограничены из-за препаративных трудностей, обусловленных весьма слабой способностью большинства низкомолекулярных пептидов к кристаллизации. Более того, даже если в некоторых случаях удастся подобрать условия, благоприятствующие кристаллизации, получаемые кристаллы могут оказаться непригодными для целей рентгеноструктурного анализа (так, например, несмотря на принципиальную возможность получения кристаллов ангиотензина [109], рентгеноструктурный анализ этого соединения до сих пор не выполнен). Кроме того, применение рентгенострук-

турного анализа для исследования пространственной структуры пептида связано с еще одним принципиальным ограничением: такого рода анализ способен охарактеризовать лишь одну из стабильных структур молекулы, т. е. задача описания полного набора стабильных структур не может быть решена с его помощью.

С другой стороны, любые экспериментально измеряемые характеристики конформационных состояний молекулы олигопептида в растворе представляют собой некоторую усредненную величину, отражающую вклад всех стабильных конформеров молекулы. Это относится как к данным об отдельных структурных элементах: расстояниях между некоторыми функциональными группами (флюоресцентный анализ, ЭПР), сравнительной подвижности различных частей молекулы (^{13}C -ЯМР-спектроскопия, титрование), вовлечении тех или иных протонов молекулы в водородные связи или экранировании их от воздействия растворителя (^1H -ЯМР-спектроскопия, кинетика изотопного обмена), так и к сведениям об общей форме молекулы и ее изменениях (КД-, ИК- и рамановская спектроскопия, диализ на тонких пленках). Таким образом, надежную характеристику той или иной детали пространственной структуры молекулы можно получить лишь при условии, что такая деталь присутствует во всех стабильных конформерах молекулы, т. е. стабильные конформеры сходны между собой по пространственной организации. Это условие, однако, налагает существенные ограничения на искомый набор стабильных конформаций молекулы, предполагая, по существу, значительное снижение конформационной подвижности молекулы. Очевидно, что наибольший успех в применении традиционных физико-химических методов может быть достигнут в случаях исследования соединений, валентная структура которых значительно ограничивает конформационную подвижность; в самом деле, по-видимому, наиболее ярким примером детального описания пространственной структуры пептида в неполярном растворителе с помощью средств физико-химического эксперимента (главным образом, ЯМР-спектроскопии) может служить исследование циклического антибиотика — ионофора валиномицина [28].

Однако ясно, что априори нет оснований полагать, что все наиболее стабильные конформеры молекулы пептида (в особенности линейного) сходны между собой. В связи с этим возникает чрезвычайно серьезная проблема «выделения» из усред-

ненной экспериментальной характеристики вклада, обусловленного присутствием того или иного конформера. Чисто экспериментальные приемы, применяемые для решения этой проблемы (например, изменение рН и ионной силы растворителя, которое должно сопровождаться изменениями набора стабильных конформаций молекулы [230]), могут, очевидно, привести лишь к частичному «разделению» тех или иных групп конформеров. В то же время корректная квантовомеханическая интерпретация данных эксперимента не только является весьма сложной в методическом и вычислительном аспектах (см., например, [205]), но и предполагает опять-таки, что набор стабильных конформаций молекулы известен.

Сказанное можно дополнить замечанием о том, что данные, полученные с помощью различных физико-химических методов, в значительной степени неравнозначны с точки зрения детальности информации о пространственной структуре молекулы; это означает, в частности, что сравнительно надежные сведения могут быть получены лишь при комплексном применении нескольких методов. В противном случае возможны грубые ошибки интерпретации; показательным примером служит упомянутое в [230] исследование структуры антибиотика грамицидина S средствами КД-спектроскопии: КД-спектры грамицидина S оказались почти идентичными характерным спектрам α -спиральной структуры, однако применение других методов физико-химического эксперимента, включая рентгеноструктурный анализ, позволило с уверенностью исключить эту структуру молекулы грамицидина S из числа возможных. Кроме того, следует считаться и с тем обстоятельством, что не только данные, относящиеся к различным экспериментальным методам, но и результаты экспериментов, проводимых различными авторами по сходным экспериментальным методикам, подчас явно противоречат друг другу (ср., например, [57, 233]).

Проиллюстрируем сказанное примерами, относящимися непосредственно к описанным в литературе моделям пространственной структуры молекулы ангиотензина [57, 104, 233, 248, 330]; почти все такие модели представляют собой попытку обобщения некоторой совокупности данных физико-химического эксперимента (исключение составляет лишь набор структур, полученный в [117] расчетными средствами, который более подробно рассматривается в разделе 1.2). Достоинства и недостатки этих моделей неоднократно обсуждались [117, 306], в

связи с тем, что

спираль

[57] на основе

соображений, а

личных аналог

аминокислотных

рали, а остальн

функциональн

гической актив

матические кол

странственно сб

ется тремя вод

дующие исслед

нии дали [102,

тов против так

гиотензина.

Состояние с

вании данных



Рис.

связи с чем здесь уместно ограничиться лишь их кратким описанием.

α -Спиральная структура. Модель, предложенная в работе [57] на основании интерпретации спектров ДОВ и некоторых соображений, связанных с функциональной активностью различных аналогов ангиотензина, включает следующие элементы: аминокислотные остатки Asp¹-Ile⁵ образуют виток правой α -спирали, а остальная часть молекулы располагается так, что три функциональные группы, существенные для проявления биологической активности (С-концевая карбоксильная группа и ароматические кольца остатков Tyr⁴ и Phe⁸), оказываются пространственно сближенными (рис. 1.1). Структура стабилизируется тремя водородными связями. Следует отметить, что последние исследования с использованием ДОВ- и КД-спектроскопии дали [102, 104, 145, 233, 317] большое количество аргументов против такой пространственной организации молекулы ангиотензина.

Состояние статистического клубка. В работе [233] на основании данных потенциометрического титрования, ДОВ и водо-

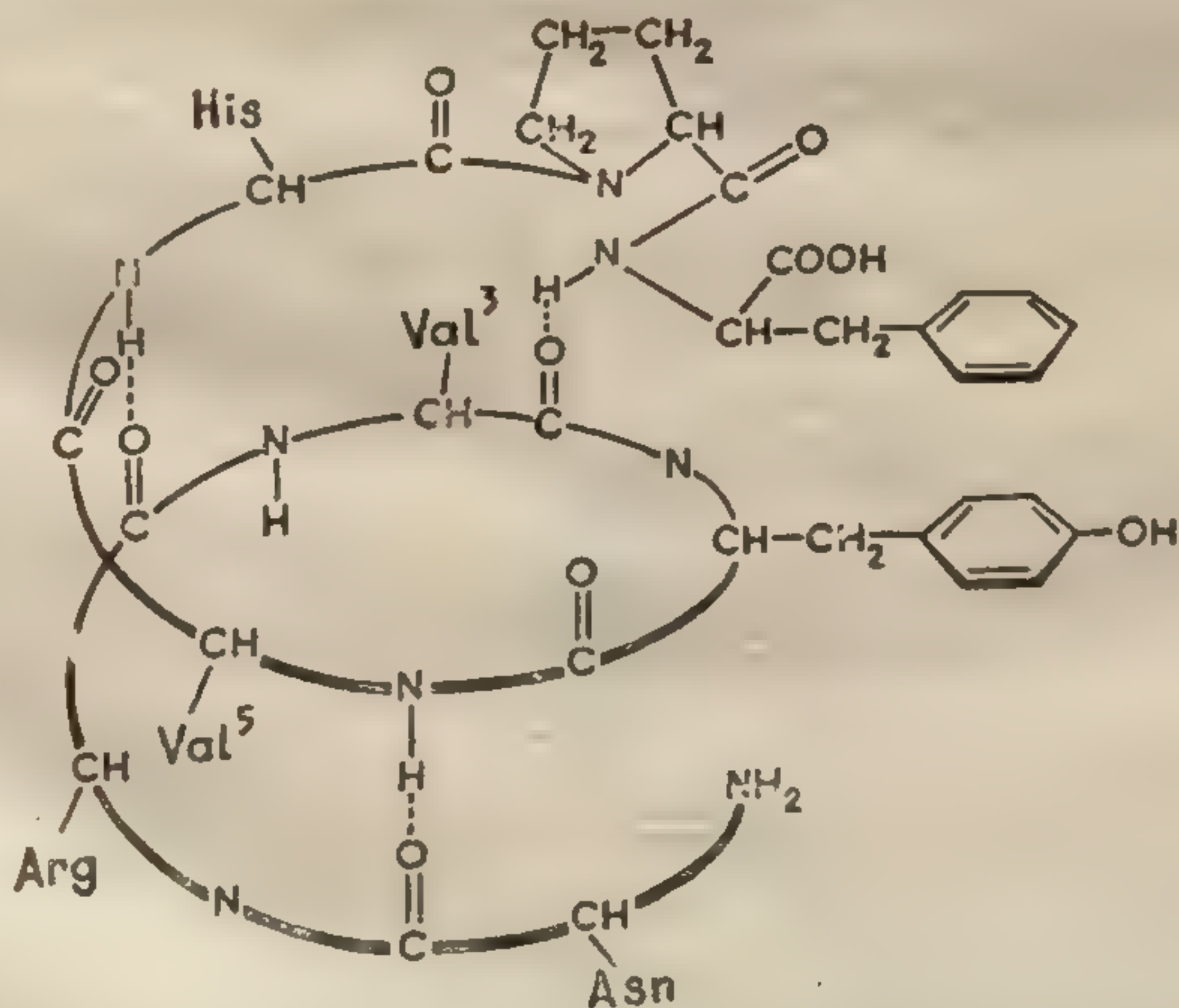


Рис. 1.1. Модель α -спиральной структуры молекулы ангиотензина [57].

родно-дейтериевого обмена высказывается предположение о существовании неупорядоченной конформации ангиотензина в водном растворе. Однако этой гипотезе противоречат данные диализа [146, 148], спектроскопии КД [102, 145, 317], а также ЯМР-спектроскопии [105, 159, 225].

Структура, предполагающая ион-дипольное взаимодействие $(\text{His}^6)\text{NH}^+\dots\text{OOC}(\text{Phe}^8)$. На основании спектров ЭПР аналога С-концевого трипептида, в котором боковая цепь остатка His^6 заменена свободнорадикальной системой, обладающей сходными стерическими и электронными свойствами, была предложена модель пространственной организации С-концевой части молекулы ангиотензина, в которой имидазольное кольцо гисти-

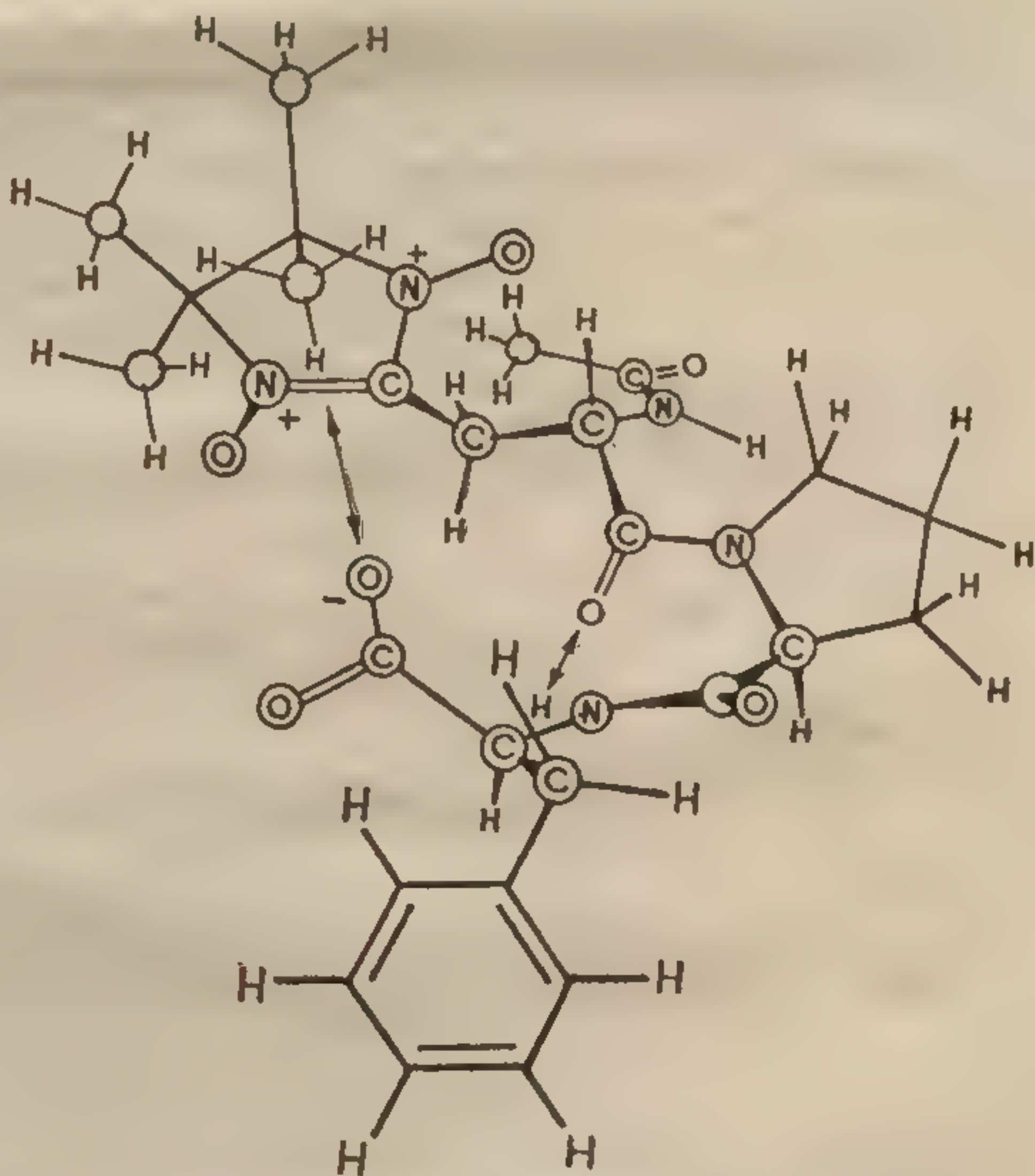


Рис. 1.2. Модель пространственной структуры ангиотензина, предполагающая ион-дипольное взаимодействие боковой цепи гистидина и С-концевого карбоксилата [330].

дина и С-концевая карбоксильная группа пространственно сближены и образуют связь ион-дипольного типа [330]. Авторы предполагают, что полученное таким образом 11-членное кольцо дополнительно стабилизируется водородной связью между группой NH остатка Phe⁸ и группой CO остатка His⁶ (рис. 1.2). Подобная модель структуры молекулы ангиотензина не согласуется, однако, с данными титрования ионогенных групп [158, 182, 189, 233, 317].

Структуры γ - и β -витков. Результаты изучения кинетики изотопного обмена [249], а также ряд соображений о гидрофобных взаимодействиях, стабилизирующих структуру молекулы, привели авторов работы [248] к гипотезе о двух возможных структурах ангиотензина: γ - и β -витках. Модель γ -витка (рис. 1.3) характеризуется наличием прочной линейной водородной связи, образуемой группами NH остатка Val³ и CO остатка Val⁵, а также более слабой, деформированной водородной связью Val⁵NH...O=CVal³. Боковые цепи остатков Val³, Val⁵ и Tyr⁴ расположены близко друг к другу по одну сторону γ -витка. Кольцо фенилаланина приближено к образующемуся гидрофобному кластеру за счет *цис*-конформации пептидной связи His⁶-Pro⁷.

Модель β -витка содержит две линейные водородные связи: Val³NH...O=CHis⁶ и His⁶N—H...O=CVal³. Боковые цепи остатков Val³, Val⁵ и Tyr⁴ также расположены по одну сторону молекулы, но расстояние между ними в модели β -витка несколько больше, чем в модели γ -витка. Пептидная связь His⁶-Pro⁷ имеет в этом случае *транс*-конформацию (рис. 1.4).

Кросс- β -формы (I и II). Еще одна модель пространственной структуры ангиотензина (в органи-

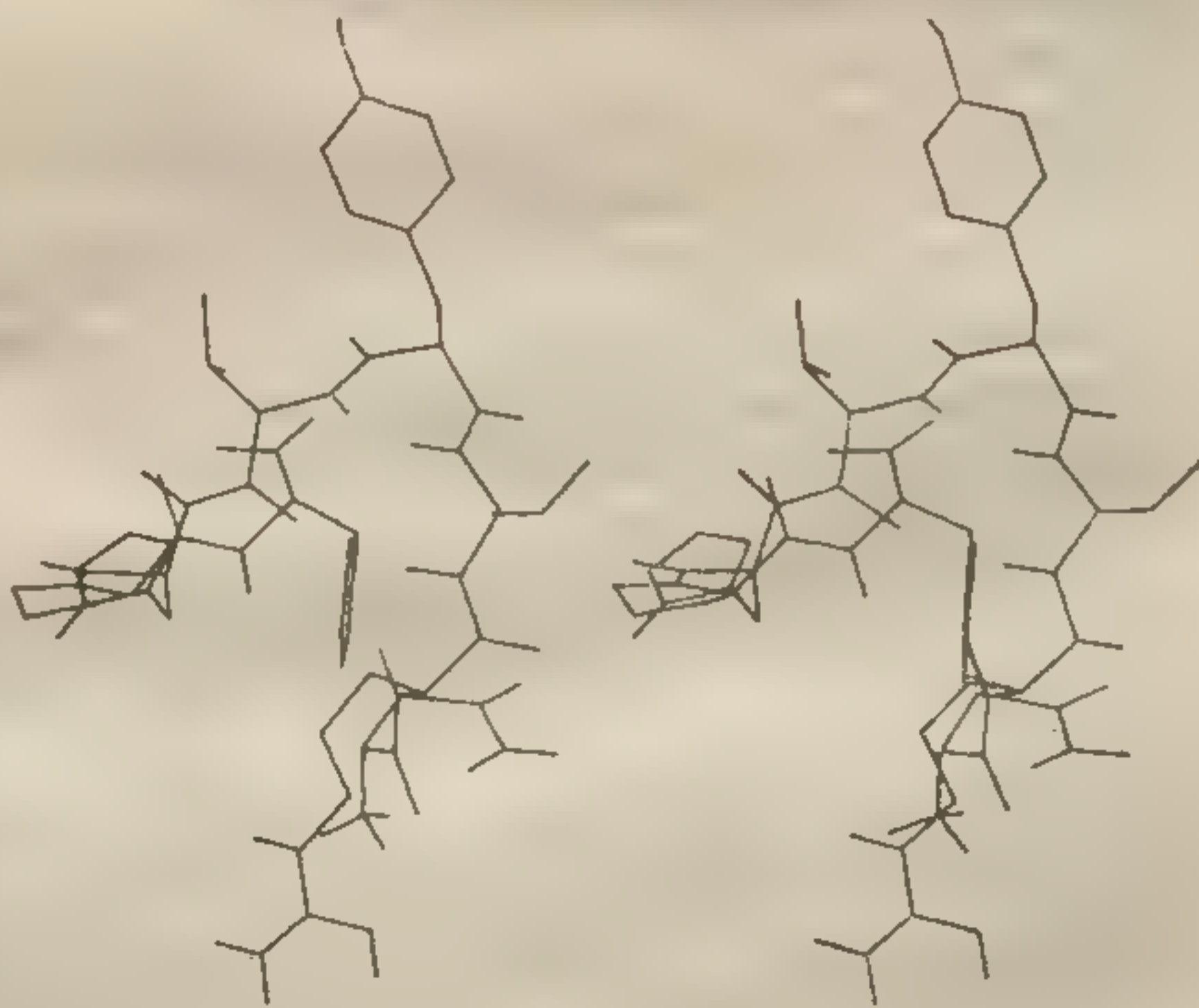


Рис. 1.3. Стереорисунок молекулы ангиотензина в конформации γ -витка (построен по значениям углов внутреннего вращения, приведенным в [248]).

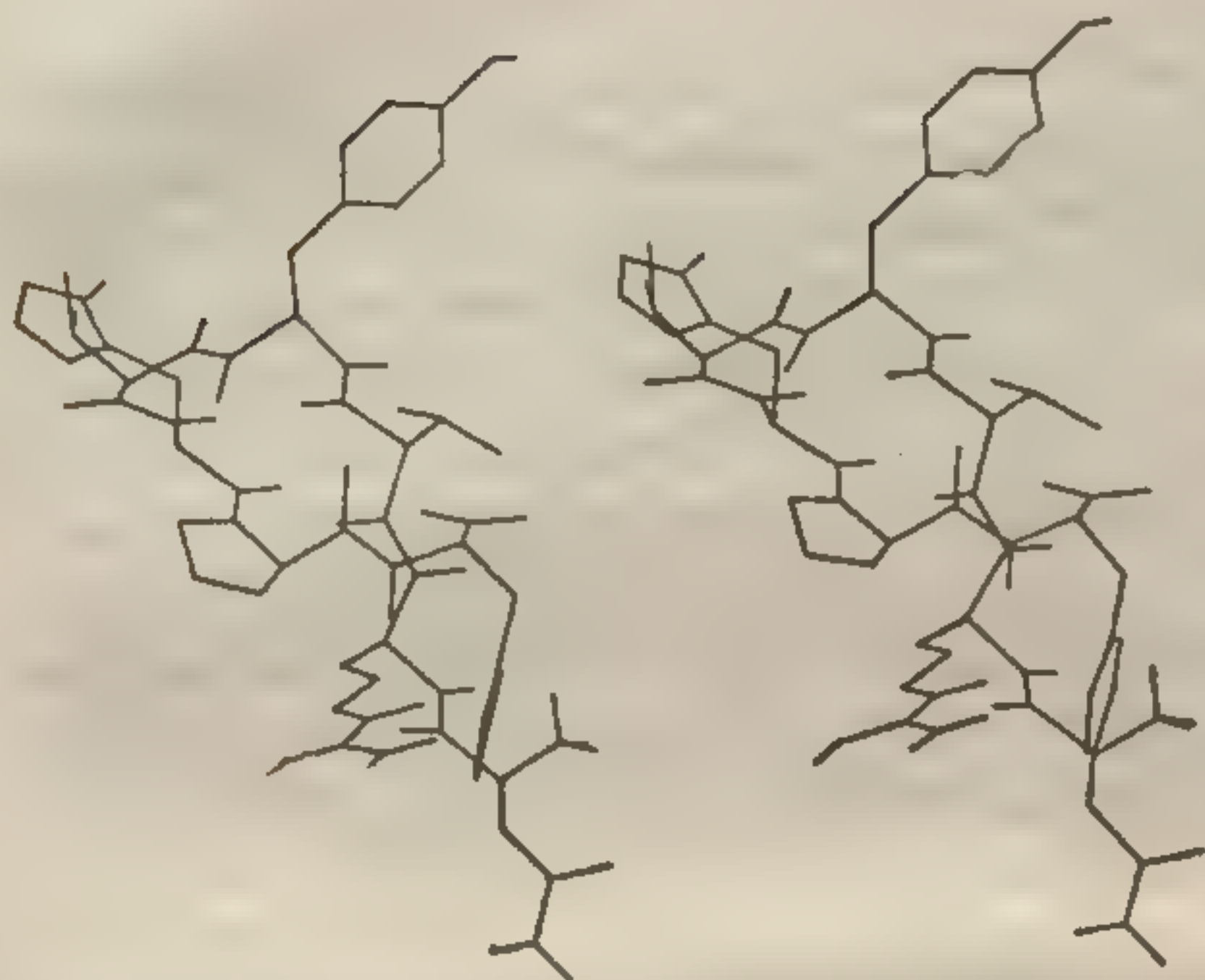


Рис. 1.4. Стереорисунок молекулы ангиотензина в конформации β -витка (построен по значениям углов внутреннего вращения, приведенным в [248]).

ческих растворителях) предложена на основании данных КД- и ИК-спектроскопии [71, 74, 102, 145, 317]. Согласно этой модели, молекула ангиотензина в органических растворителях имеет структуру кросс- β -типа, характеризующуюся двумя изгибами полипептидной цепи, один из которых образуется остатками Val³, Tyr⁴ и Val⁵, а другой достигается *цис*-конфигурацией пептидной связи His⁶-Pro⁷. В этой модели (кросс- β -форма I; рис. 1.5) оказываются сближенными гидрофоб-

ные боковые цепи остатков Val³ и Phe⁸, указание на взаимодействия которых содержится, по мнению авторов, в температурной зависимости КД-спектров ангиотензина, а виток в С-концевой части молекулы стабилизируется водородной связью Phe⁸N—H...O=CHis⁶.

В работе [306] высказано предположение, что авторы модели кросс- β -формы I «переинтерпретируют» имеющиеся у них экспериментальные данные и сообщают своей модели такие детали, которые не могут быть получены методами КД- или ИК-спектроскопии. Это замечание кажется тем более справедливым, что те же данные КД- и ИК-спектроскопии, дополненные результатами ЯМР-спектроскопии, послужили основой для еще одной модели с изгибом кросс- β -типа — кросс- β -формы II (рис. 1.6), предложенной теми же авторами [104]. Эту модель характеризуют изгиб типа β -витка в районе остатков Asn¹-Arg²-Val³ и изгиб в районе остатка Pro⁷, причем пептидный остов рассматриваемой структуры стабилизируется пятью водородными связями. N- и С-концы молекулы оказываются сближенными, пептидная связь His⁶-Pro⁷ имеет *транс*-конформацию.

На примере моделирования пространственной структуры молекулы ангиотензина по результатам физико-химических экспе-

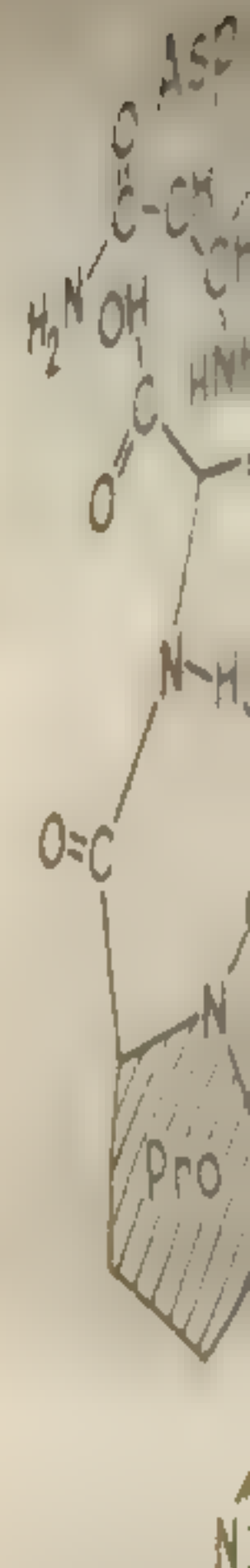


Рис. 1.5. Молекула ангиотензина в кросс- β -форме I.

риментов можно трудной является татов. В самом моделей пространств противоречат друг представляет собой кулы, удовлетворя В то же время ниже (см. раздел периментальных кулы ангиотензин. Поэтому естествен к обратной стр стоятельных бы во лательных данн талями так мационного

Конформации молекулы ангиотензина

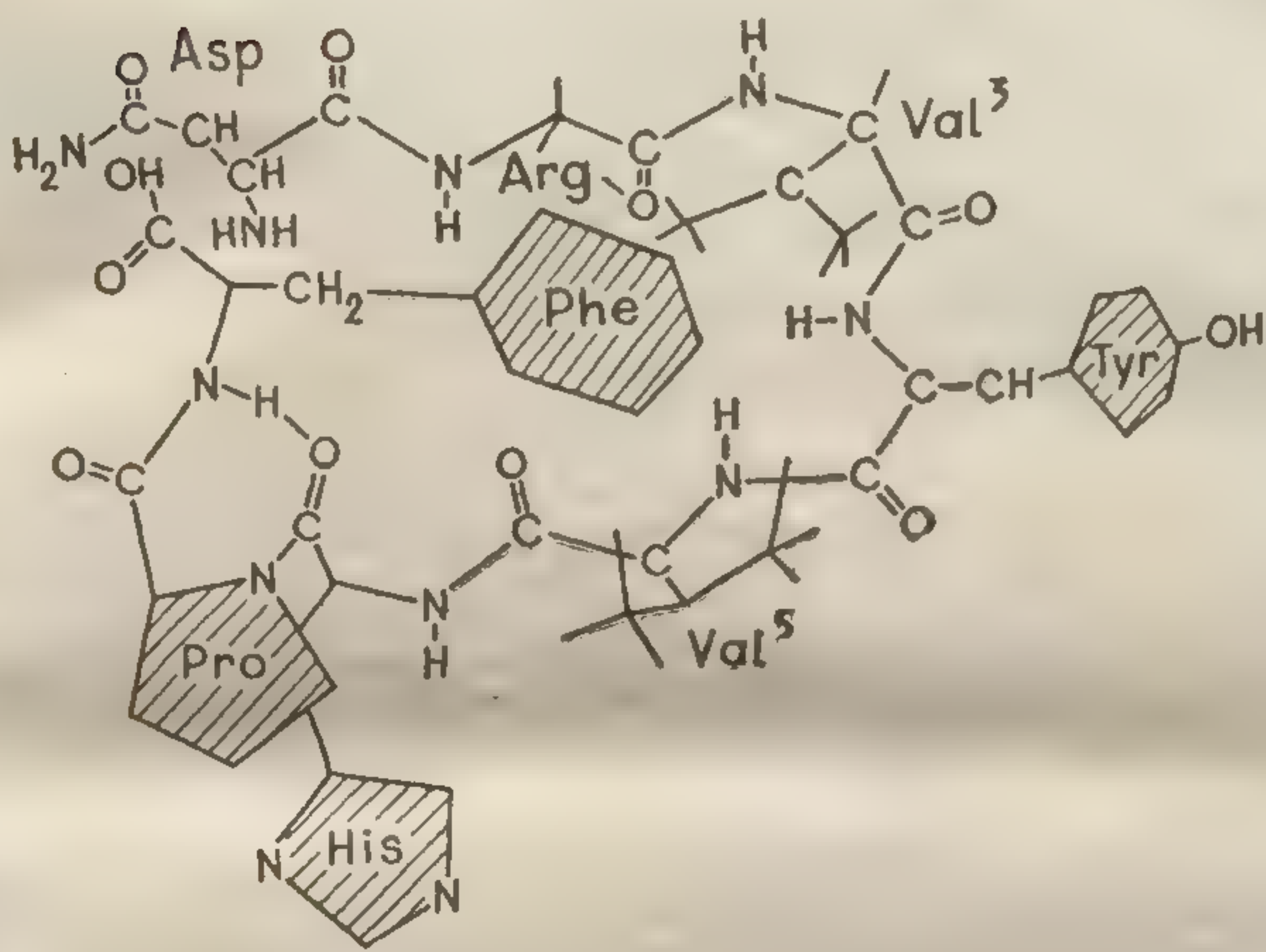


Рис. 1.5. Модель кросс- β -формы I молекулы ангиотензина [74].

риментов можно с наглядностью убедиться в том, насколько трудной является задача прямой интерпретации таких результатов. В самом деле, помимо того, что семь описанных выше моделей пространственной структуры молекулы ангиотензина противоречат друг другу во многих деталях, каждая из них представляет собой лишь одну из возможных структур молекулы, удовлетворяющих требованиям данного эксперимента. В то же время ни одна из этих моделей, как будет показано ниже (см. раздел 1.3), не удовлетворяет всей совокупности экспериментальных сведений о пространственной структуре молекулы ангиотензина.

Поэтому естественно, что внимание исследователей обращается к обратной задаче — установлению круга стерически состоятельных структур молекулы ангиотензина, среди которых оказалось бы возможным выделить набор конформаций, удовлетворительно согласующийся со всеми наличными экспериментальными данными. Эта задача может быть в принципе решена средствами так называемого тотального теоретического конформационного анализа [9, 13, 256, 277], позволяющего оценить

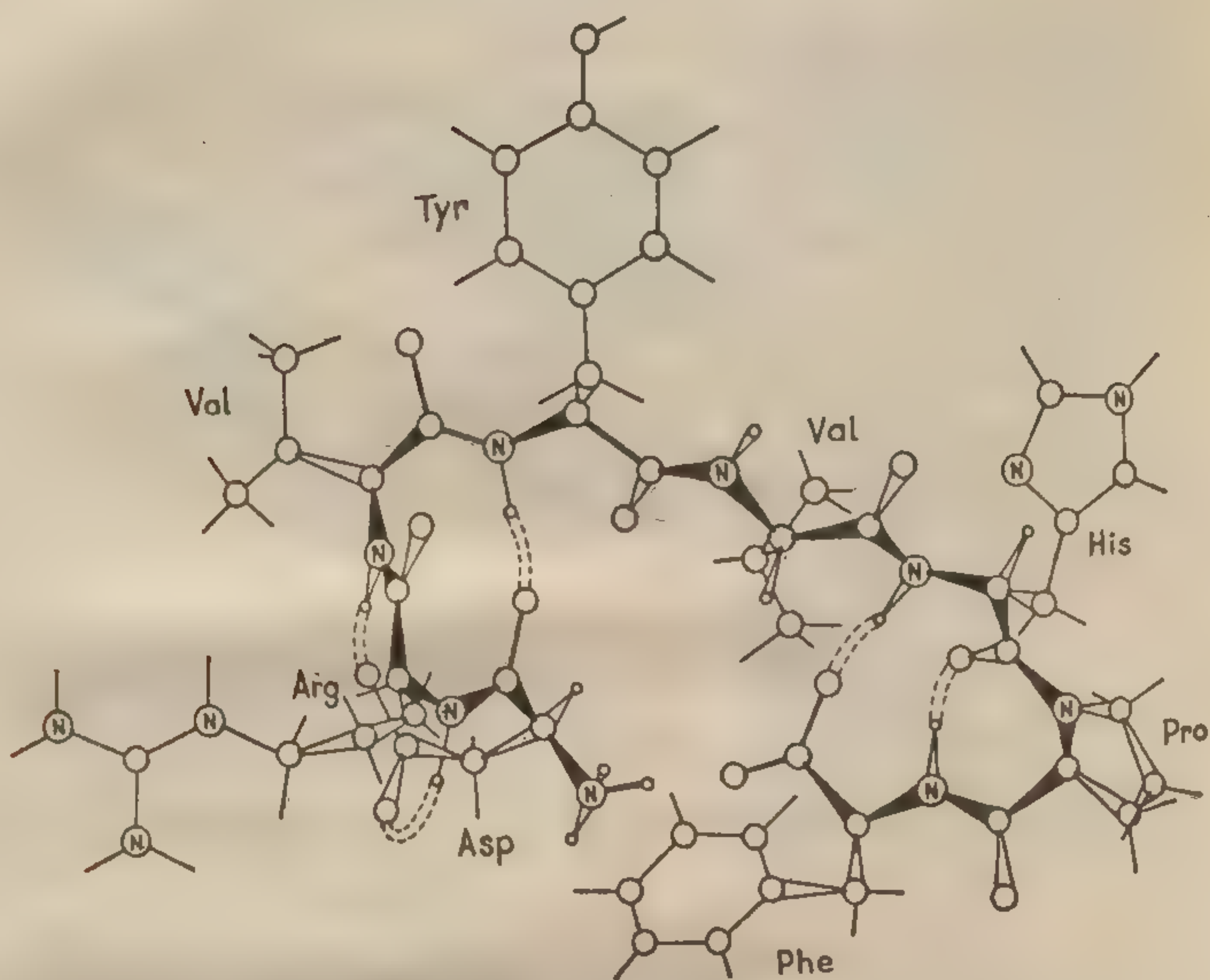


Рис. 1.6. Модель кросс- β -формы II молекулы ангиотензина [104].

стабильность каждой из возможных конформаций молекулы с помощью расчета внутримолекулярной энергии и в общем случае — энергии взаимодействия с растворителем.

1.2. ТОТАЛЬНЫЙ ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЫ АНГИОТЕНЗИНА

Существующие методы теоретического конформационного анализа различаются по физическим моделям, положенным в основу расчета конформационной энергии. Квантовохимические методы, рассматривающие молекулу как единую электронно-ядерную систему, являются, вообще говоря, более корректными, однако затруднения, связанные с их параметризацией, и, главное, чрезвычайно громоздкие вычислительные процедуры прак-

В рамках полуэмпирического конформационного анализа общая постановка задачи определения полного набора стерически состоятельных структур молекулы олигопептида заключается в последовательном ограничении круга возможных конформаций молекулы, причем критерием в этом случае служит внутримолекулярная конформационная энергия, величина которой определяется, как уже указывалось, всей совокупностью внутримолекулярных взаимодействий. Тем не менее оценки ряда авторов [34, 244] показали, что в случае пептидных молекул удастся провести некоторую дифференциацию внутримолекулярных взаимодействий с точки зрения удаленности взаимодействующих атомов вдоль главной валентной цепи и роли соответствующих взаимодействий в стабилизации пространственной структуры молекулы. Принято разделять рассматривать взаимодействия, определяющие локальные стерические условия, т. е. взаимодействия между атомами, входящими в состав одной дипептидной единицы молекулы; ближние взаимодействия, или взаимодействия внутри фрагментов из нескольких аминокислотных остатков, соседних по расположению в аминокислотной последовательности, и дальние взаимодействия, или взаимодействия между атомами остатков, значительно удаленных друг от друга в аминокислотной последовательности. (Некоторые авторы пользуются терминами «ближние», «средние» и «дальние» взаимодействия.)

Локальные стерические условия дипептидных единиц, хорошо изученные с помощью теоретического конформационного анализа в попарно-аддитивном приближении [14, 202], по очевидным причинам должны играть весьма существенную роль в ограничении конформационной свободы аминокислотного остатка. Это предположение полностью согласуется с данными рентгеноструктурного анализа белков и пептидов; действительно, даже в молекулах белков, для которых вклад дальних взаимодействий особенно велик, экспериментально обнаруженные значения углов внутреннего вращения пептидного остова — ϕ и ψ отдельных аминокислотных остатков, как правило, попадают в стерически «разрешенные» области карт этих остатков (рис. 1.7). Более того, значения углов внутреннего вращения в боковых цепях, полученные из данных рентгеноструктурного анализа, также (хотя и в меньшей степени) близки к расчетным. Таким образом, можно с уверенностью утверждать, что круг возможных конформаций отдельных аминокислотных остатков, обра-



Рис. 1.7. Стерические карты аминокислотных остатков. Показаны области стерически разрешенных конформаций.

Конформации молекулы ангиотензина

зующих пептидную молекулу, определяется их локальными стерическими условиями.

Следует, однако, подчеркнуть, что в пределах энергетически «разрешенных» областей конформационных карт аминокислотные остатки обладают заметной конформационной подвижностью, т. е. имеют непрерывный спектр конформаций. Выбор данным остатком некоторой конформации из этого спектра определяется всей совокупностью ближних и дальних взаимодействий в пептидной молекуле. Эти же взаимодействия во многом определяют выбор данным остатком по локальным стерическим условиям той или иной из имеющихся для него областей «разрешенных» конформаций. Именно проблема «выбора» для каждого аминокислотного остатка окрестности того или иного локального минимума конформационной энергии является центральной в процессе поиска наиболее стабильной конформации молекулы пептида методами теоретического конформационного

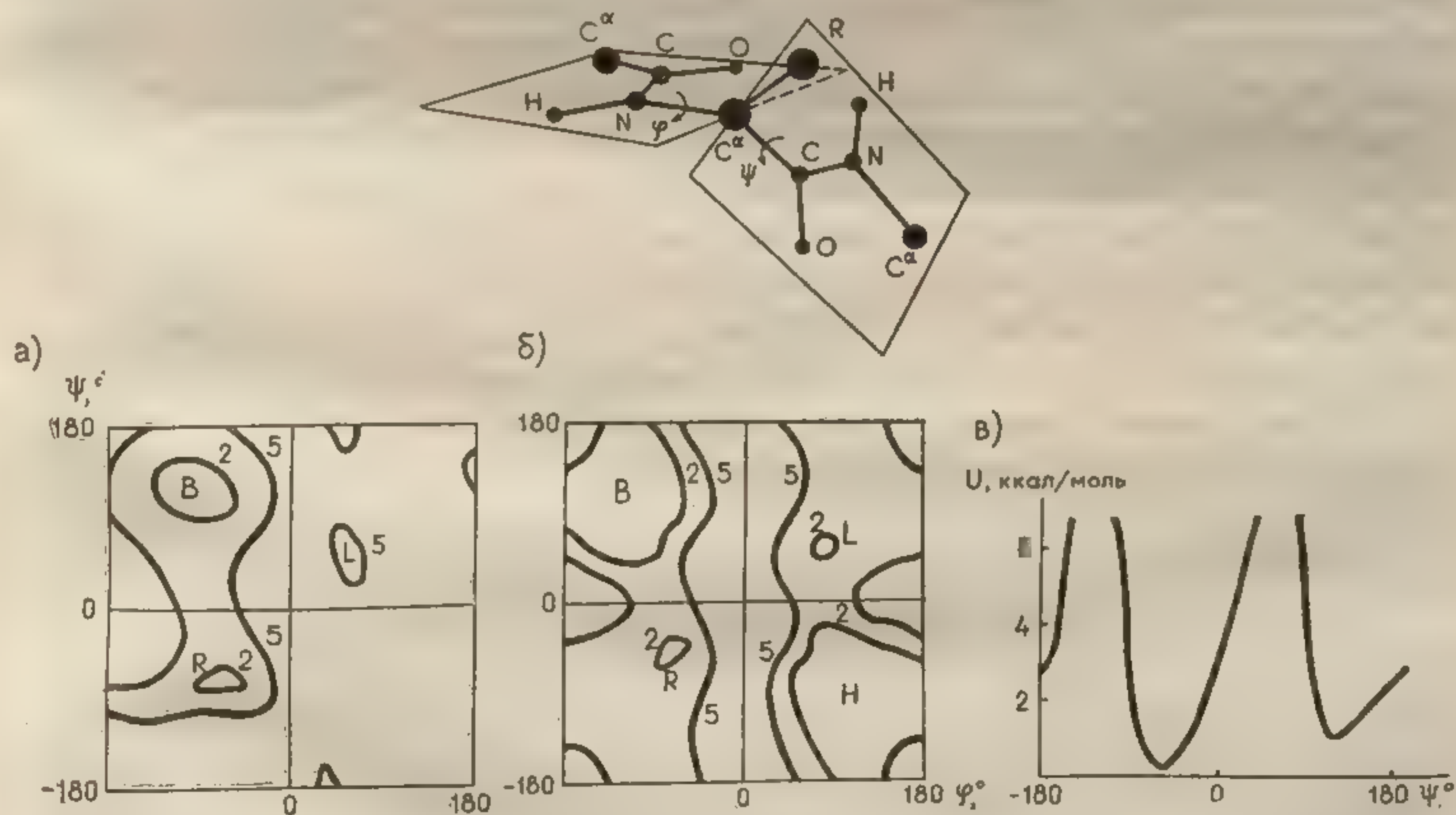


Рис. 1.7. Стерические условия остова дипептидных единиц аминокислотных остатков, потенциальные карты монопептидов: а — остатка, содержащего C^β-атом; б — глицина; в — пролина. Цифры на картах обозначают уровни эквипотенциалей (ккал/моль).

анализа. Первичная классификация конформаций молекулы осуществляется обычно на основе поворотно-изомерного приближения, а процедура анализа предполагает получение некоторых оценок стабильности всех возможных сочетаний конформаций отдельных аминокислотных остатков, соответствующих различным локальным минимумам конформационной энергии дипептидных единиц остатков.

Как показывают данные теоретического и экспериментального изучения пространственной структуры белков и пептидов, для дипептидных единиц L-аминокислот, встречающихся в белках («монопептиды»), характерны, как правило, три области низкоэнергетических конформаций пептидного остова: В ($\varphi \sim -140^\circ$, $\psi \sim 140^\circ$), R ($\varphi \sim -100^\circ$, $\psi \sim -50^\circ$), L ($\varphi \sim 40^\circ$, $\psi \sim 60^\circ$) (см. рис. 1.7). (Обозначения углов даны в соответствии с [185].) Исключение составляют остатки глицина (появление области Н ($\varphi \sim 80^\circ$, $\psi \sim -80^\circ$)) и пролина (исключение области L) (см. рис. 1.7). Необходимо заметить также, что для аминокислотных остатков, предшествующих в аминокислотной последовательности пролину, область R оказывается энергетически «запрещенной» [19, 111]. Наконец, в ряде расчетных работ (например, [45]) содержится утверждение о наличии значительной стерически разрешенной области в окрестности минимума Н на картах неглициновых остатков; следует указать, однако, на отсутствие надежных экспериментальных данных, в первую очередь данных рентгеноструктурного анализа, подтверждающих наличие конформации такого типа в остове неглициновых остатков исследованных белков и пептидов.

Число минимумов конформационной энергии одного остатка, определяемое его локальными стерическими условиями, колеблется в зависимости от типа аминокислотного остатка от нескольких единиц до нескольких десятков: это означает, что число возможных конформаций олигопептида, состоящего из n остатков, можно грубо оценить как 10^n ; ясно, что уже при $n=5-7$ простой перебор всех возможных конформаций олигопептида не имеет смысла. Поэтому основной проблемой теоретического конформационного анализа олигопептидов становятся разработка и обоснование некоторых методических приемов, позволяющих, с одной стороны, как можно более ограничить круг конформаций, подлежащих рассмотрению на каждом этапе расчета, а с другой — гарантировать, что ни одна из потенциально стабильных конформаций не окажется при этом отброшенной.

Алгоритм, удовлетворяющий, в принципе, сформулированным выше условиям, был предложен в работе [15]; его суть состоит в расчете конформационных энергий U олигопептидных фрагментов, «перекрывающихся» в аминокислотной последовательности пептида (например, трипептиды XYZ и YZT), конформационной энергии пересекающейся части последовательности (дипептид YZ) и последующем расчете энергии «ближних» взаимодействий E более крупного фрагмента (тетрапептид XYZT) с помощью выражения

$$E_{XYZT} = U_{XYZ} + U_{YZT} - U_{YZ}. \quad (1.1.1)$$

Следует учитывать, что все значения энергии U берутся для конформаций олигомеров, поостаточно соответствующих друг другу в пересекающейся части с точностью до окрестности локального минимума. (Ясно, что длины «сшиваемых» по такому алгоритму фрагментов могут быть произвольными: три- и дипептиды рассмотрены лишь в качестве примера.) Процедура отбора конформаций более крупного фрагмента заключается далее в выделении конформации с наименьшей энергией E_{\min} и в исключении конформаций, не удовлетворяющих условию $E - E_{\min} \leq \Delta E$, где ΔE — некоторая величина, представляющая, по существу, априорный предел энергии дальних взаимодействий в данном фрагменте. Для конформаций, отобранных по такому критерию, затем производится расчет полной конформационной энергии U фрагмента.

Описанный алгоритм в сочетании с «поостаточным наращиванием», т. е. с последовательным увеличением длины пептидной цепи на один аминокислотный остаток, был успешно использован ранее при расчете пространственных структур молекулы брадикинина [20], однако следует учитывать, что гарантия сохранения всех потенциально стабильных структур молекулы обеспечивается в данном подходе достаточно большой величиной ΔE , что влечет за собой необходимость рассмотрения все еще слишком значительного количества конформаций. Это обстоятельство заставляет изыскивать возможные модификации описанной методики. В частности, для поиска стабильных конформаций можно использовать предположение о том, что иерархия стабильности различных структур олигопептидного фрагмента определяется в основном конформацией пептидного остов, от которой зависят общие пространственные очертания фрагмента и, следовательно, возможность реализации взаимо-

действий типа «остов—боковая цепь» и «боковая цепь—боковая цепь», роль которых сводится к стабилизации тех или иных пространственных структур, предопределенных конформацией остова. (Сказанное не относится к ситуации, когда следует учитывать дающие весьма существенный вклад в конформационную энергию электростатические взаимодействия ионогенных групп: в этом случае конформация боковой цепи, несущей ионогенную группу, должна быть «приравнена» к конформации пептидного остова.) Если дополнить это предположение учетом возможности дальних взаимодействий в рассматриваемом фрагменте (например, с помощью оценки расстояний между остатками, взаимодействие которых не дает вклад в величину энергии E), то предлагаемую модификацию методики отбора структур фрагмента для дальнейшего «поостаточного наращивания» можно в основном свести к следующему:

1) по алгоритму (1.1.1) рассчитывается энергия ближних взаимодействий E фрагмента;

2) производится оценка возможности дальних взаимодействий;

3) из тех конформаций остова фрагмента, для которых наличие дальних взаимодействий маловероятно, отбираются лишь такие, которые при оптимальном (с точки зрения энергий E) расположении боковых цепей удовлетворяют избранному критерию ΔE ;

4) в случаях, когда дальние взаимодействия могут оказаться существенными, для последующего рассмотрения отбираются структуры, различающиеся типом конформации остатков, вовлекаемых в возможные дальние взаимодействия, и типом конформации остова остатков, не принимающих в них участия (отбор производится по критерию $\Delta E_1 > \Delta E$);

5) по результатам отбора по обоим критериям производится расчет энергий U отобранных структур с последующим отбором по критерию ΔU .

Подобный подход существенно ограничивает число рассматриваемых структур фрагмента, сохраняя в то же время все потенциально стабильные конформации остова. Следует, однако, иметь в виду, что установленные заранее величины критериев ΔE , ΔE_1 и ΔU сами по себе не могут гарантировать учета в дальнейшем всех возможных стабильных структур молекулы, так что на каждом последующем этапе «поостаточного наращи-

вания» (если не
рять, сохраняется
меньшего фрагме
тивном случае не
 ΔE и ΔU и вы
остаточного нара
нение взаимодей
дится на последн
ления набора с
несмотря на то
ляются с точнос
можно достаточн
менения конфор
конформации ос

Тотальный т
кулы ангиотензи
стоящем разделе
выше. Следует,
многом отличает
способов ограни
кулы. Одним из
ных небольших
чением менее
[33—35]. Однак
терять» те кон
дальних взаимо
попытка компе
ния» критерия о
ведет к резкому
мянуть схему по
в [184], которая
леме, а, по суще
ких приемов да
тур молекулы.
Описание мо
в основу поиско
следует дополн
к технике расче
ное описание с
ряде обзоров [1
лишь тем ос

вания» (если используется именно этот прием) следует проверять, сохраняется ли в общих чертах иерархия стабильности меньшего фрагмента при включении в состав большего; в противном случае необходимо увеличить величины критериев ΔE , ΔE_1 и ΔU и вновь провести всю процедуру данного этапа «последочного наращивания». Можно отметить также, что уточнение взаимозависимых конформаций боковых цепей производится на последнем этапе расчета, после окончательного выделения набора стабильных структур остова. Таким образом, несмотря на то что стабильные структуры молекулы определяются с точностью до конформаций боковых цепей, всегда можно достаточно корректно оценить энергетический эффект изменения конформации той или иной боковой цепи при данной конформации остова.

Тотальный теоретический конформационный анализ молекулы ангиотензина, результаты которого будут изложены в настоящем разделе, был проведен с помощью методики, описанной выше. Следует, однако, отметить, что подобная методика во многом отличается от других предложенных в последние годы способов ограничения числа возможных конформаций молекулы. Одним из них, в частности, является рассмотрение отдельных небольших фрагментов молекулы с последующим исключением менее стабильных конформаций таких фрагментов [33—35]. Однако при таком подходе существует опасность «потерять» те конформации, которые стабилизируются системой дальних взаимодействий молекулы в целом. С другой стороны, попытка компенсировать этот недостаток с помощью «смягчения» критерия отбора «разрешенных» по энергиям конформаций ведет к резкому увеличению их числа. Кроме того, следует упомянуть схему поиска стабильных конформаций, предложенную в [184], которая, однако, не является единым подходом к проблеме, а, по существу, представляет собой совокупность нескольких приемов для предварительного отбора компактных структур молекулы.

Описание общих методических рекомендаций, положенных в основу поиска стабильных структур молекулы ангиотензина, следует дополнить сведениями, относящимися непосредственно к технике расчета конформационной энергии. Поскольку детальное описание стандартных приемов такого рода содержится в ряде обзоров [13, 256, 277], ниже основное внимание уделяется лишь тем особенностям, которые отличают методы расчета,

использованные для дальнейшего исследования пространственной структуры молекулы ангиотезина, от стандартных.

С чисто вычислительной точки зрения основной процедурой конформационных расчетов является отыскание минимумов потенциальной энергии внутримолекулярных взаимодействий в пространстве геометрических параметров молекулы, причем локальному минимуму ставится в соответствие та или иная пространственная структура молекулы; по полученным величинам энергии минимумов можно впоследствии судить об относительной стабильности пространственных структур. Очевидно, решение подобной задачи предусматривает: а) задание координат атомов молекулы (т. е. геометрическое описание молекулы); б) задание потенциальных функций межатомных взаимодействий; в) выбор алгоритма поиска локальных минимумов потенциальной энергии внутримолекулярных взаимодействий.

Координаты атомов молекулы ангиотензина задавались в описываемом расчете в так называемом приближении «жесткой» геометрии, предусматривающем недеформируемость валентных связей и валентных углов [7]; в таком приближении потенциальная энергия межатомных взаимодействий сложной молекулы обычно представляется в виде суммы членов, соответствующих невалентным взаимодействиям, электростатическим взаимодействиям, водородным связям (во всех случаях учитываются лишь взаимодействия валентно не связанных атомов) и торсионным потенциалам:

$$U = \sum_{i \neq j} U_{\text{нев}}(r_{ij}) + \sum_{i \neq j} U_{\text{эл}}(r_{ij}) + \sum_{m, n} U_{\text{вс}}(\mathbf{r}_m, \mathbf{r}_n) + \sum_k U_{\text{торс}}(\varphi_k),$$

где r_{ij} — расстояние между i -м и j -м валентно не связанными атомами; векторы \mathbf{r}_m и \mathbf{r}_n определяют положение функциональных групп, способных образовывать внутримолекулярные водородные связи; φ_k — углы внутреннего вращения. Кроме того, при выделении окончательного набора наиболее стабильных конформаций ангиотензина учитывалась свободная энергия гидратации молекулы (по алгоритму, описанному в [177]).

Невалентные воздействия описывались потенциальными функциями Леннард-Джонса (потенциал 6-12):

$$U_{\text{нев}}(r_{ij}) = A_{ij}r_{ij}^{-12} - D_{ij}r_{ij}^{-6}.$$

Для взаимодействий атомов C, O, N и H была принята система потенциальных функций, предложенных В. Г. Дашевским

[13] и аппроксимированных к виду 6-12. Взаимодействия с участием функциональных групп CH , CH_2 и CH_3 описывались с помощью псевдоцентральных потенциалов, полученных в работе [41] усреднением положения атомов водорода на сфере с центром в атоме C и радиусом, равным длине связи $\text{C}-\text{H}$ при использовании атом-атомных потенциалов [13].

Электростатические взаимодействия, обусловленные нарушением электронейтральности отдельных атомов и функциональных групп, учитывались в монополь-монопольном приближении. Выбор значения диэлектрической постоянной ϵ подробно обсуждался в работах [8, 255]; в последующих расчетах использовалось макроскопическое значение $\epsilon = 3,5$, совпадающее с экспериментально измеренным для плотной упаковки амидов [131].

Для большинства атомов пептидной цепи и боковых цепей аминокислот были приняты парциальные заряды, приведенные в работе [277]; исключение составляют лишь парциальные заряды атомов ионогенных групп (N -концевой аминогруппы, C -концевой карбоксильной группы и гуанидиновой группы аргинина), которые получены разложением дипольных моментов сходных химических соединений.

Торсионные потенциалы, введение которых связано с учетом «эффекта ориентации связей», зависят только от угла поворота вокруг одинарной связи и записываются в виде

$$U_{\text{торс}} = \frac{U_0}{2} [1 + \cos n\varphi],$$

где U_0 — высота потенциального барьера; n — кратность потенциала, зависящая от симметрии расположения заместителей у связи, вокруг которой осуществляется вращение. Ниже использовались параметры торсионных потенциалов, приведенные в обзоре [277]. Низкие значения высоты барьеров U_0 для вращения углов φ и ψ пептидного остова позволили пренебречь соответствующими торсионными потенциалами.

Существенную трудность представляет учет энергии водородной связи, причем основные затруднения обычно связаны с учетом ее угловой зависимости. Однако в работе [17] показано, что эта угловая зависимость обусловлена главным образом невалентными взаимодействиями заместителей донора и акцептора и при корректном учете этих взаимодействий может быть опущена. С другой стороны, надежная экспериментальная проверка возможна лишь для двух характеристик водородной

связи: равновесной длины и энергии диссоциации. В последующих расчетах использовался потенциал, предложенный в [26], который представляет собой потенциальную функцию Леннарда-Джонса с параметрами, подобранными таким образом, чтобы в сочетании с обычным электростатическим членом взаимодействия донорной и акцепторной групп получить экспериментальные значения длины и энергии диссоциации водородной связи.

Минимизация потенциальной энергии межатомных взаимодействий в описываемых расчетах выполнялась методом сопряженных градиентов [39]. Производные потенциальной энергии по углам внутреннего вращения рассчитывались аналитически с помощью алгоритма, предложенного в работе [7].

Все расчеты, результаты которых описаны далее, проводились на ЭЦВМ «Минск-32» и ЕС 1020; использовался комплекс универсальных программ теоретического конформационного анализа, составленный на алгоритмическом языке ФОРТРАН-IV [51].

Процедура «поостаточного наращивания» молекулы ангиотензина в сочетании с алгоритмом «сшивания» молекулы и оценкой энергий E ближних внутримолекулярных взаимодействий (см. выше) проводилась в направлении от С-конца к N-концу аминокислотной последовательности ангиотензина. Выбор такого направления связан главным образом с тем, что расчет С-концевых фрагментов ангиотензина может представлять самостоятельную ценность: С-концевые участки (гекса- и гептапептид) обладают заметной функциональной активностью (см., например, [262]).

На рис. 1.8 представлены схема валентной структуры молекулы ангиотензина (АТ) и схема разбиения молекулы на отдельные фрагменты в соответствии с этапами расчетов. (Рассматривалась *транс*-конформация связи $\text{His}^6\text{-Pro}^7$ [124].) Совокупность возможных конформаций молекулы определялась по результатам расчета стабильных конформаций дипептидных единиц аминокислотных остатков, входящих в его состав; соответствующие конформации использовались в дальнейшем как «стартовые точки» процесса минимизации конформационной энергии (табл. 1.1). Ниже излагаются основные результаты расчета фрагментов молекулы АТ в соответствии со схемой рис. 1.8; первым из таких фрагментов явился С-концевой пентапептид молекулы (АТ 4—8).

Фрагмент АТ 4—8. Исследование структуры фрагмента АТ



Рис. 1.8. Схема усло

4—8 по алгоритму
ближних взаимодействий U перекрывающихся трипептидов в сочетании с проведенными расчетами $\Delta E \sim 10$ ккал/моль для конформаций, в которых такие взаимодействия молекулы рассматривались. Интересно отметить, что конформация остатков углов внутреннего вращения будет называться необходимыми фрагментами АТ 3—8 использовались

тически полностью исключают их применение к расчетам олигопептидов: максимально доступными объектами для этих методов являются в настоящее время соединения, состоящие всего из двух-трех десятков атомов [250]. В этих условиях хорошо зарекомендовали себя методы полуэмпирического конформационного анализа [9, 13, 256, 277], основанные на попарно-аддитивном приближении, т. е. на предположении, что внутримолекулярная энергия есть сумма энергий попарных взаимодействий атомов молекулы. Так, например, в работе [10] выполнен полуэмпирический конформационный анализ молекулы биологически активного пептида глутатиона. Определены две стабильные конформации этого трипептида, одна из которых близка конформации глутатиона в кристаллическом состоянии, установленной экспериментально [333]. Аналогичными методами детально исследована пространственная структура тиролиберина — трипептида с аминокислотной последовательностью pGlu-His-Pro [44, 94]. Кроме того, успешно решена задача детального определения пространственной структуры пептидного гормона брадикинина — нонапептида с аминокислотной последовательностью Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg [20].

Можно упомянуть также работы по расчету стабильных структур пентапептида Met-энкефалина [116, 140, 184], нонапептида, представляющего собой один из брадикининпотенцирующих пептидов [42, 43], а также циклического декапептида антаманίδα [11]. Наконец, недавно опубликованы сообщения [36, 37, 216, 217] об определении стабильных конформаций люлиберина. Этот декапептид является, по-видимому, наибольшим линейным пептидом, подробно исследованным методами полуэмпирического конформационного анализа.

Упомянутые работы характерны тем, что в них проведен тотальный полуэмпирический анализ олигопептидов, т. е. исследована, в принципе, стабильность всех возможных конформаций олигопептида, допускаемых в поворотно-изомерном приближении (см., например, [20]). Кроме того, в ряде работ проведен частичный анализ конформационных особенностей тех или иных биологически активных пептидов: ангиотензина [248], окситоцина [21, 22, 199], грамицидина S [277] и др. В настоящее время методами полуэмпирического конформационного анализа рассмотрено более десятка олигопептидов и принципиальная возможность решения подобных задач средствами полуэмпирического конформационного анализа не вызывает сомнений.

Конформации молекулы ангиотензина

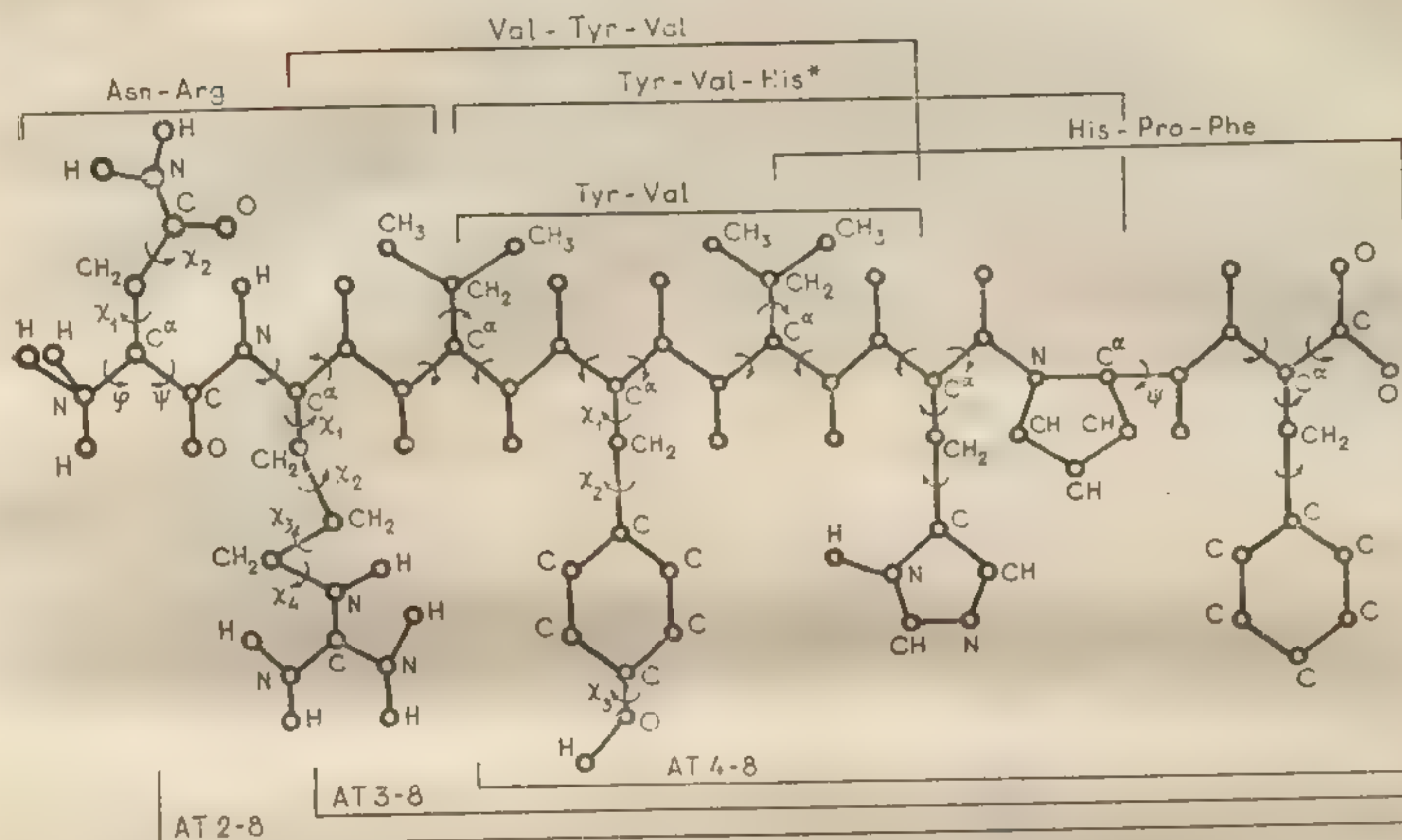


Рис. 1.8. Схема условного разбиения молекулы ангиотензина на перекрывающиеся фрагменты.

4—8 по алгоритму (1.1.1) было доведено до расчета энергии ближних взаимодействий E с предварительным расчетом энергий U перекрывающихся по аминокислотной последовательности трипептидов. Анализ энергий E фрагмента АТ 4—8 в сочетании с проведенной оценкой расстояний между остатками $\text{Tyr}^4\text{-Phe}^8$ и $\text{Val}^5\text{-Phe}^8$ позволил выделить 26 типов структур остова ($\Delta E \sim 10$ ккал/моль), в которых наличие дальних взаимодействий маловероятно, и 9 типов структур ($\Delta E_1 \sim 17$ ккал/моль), в которых такие взаимодействия возможны. Эти структуры и послужили основой для дальнейшего «поостаточного наращивания» молекулы; расчет энергий U в некоторых из них показал, что соответствующие значения E и U различаются незначительно. Интересно отметить, что в некоторых структурах конформация остова остатка Val^5 (при $\chi_1 \sim -60^\circ$) характеризуется углами внутреннего вращения $\phi \sim -100^\circ$ и $\psi \sim 20^\circ$ (в дальнейшем будем называть ее конформацией типа Q), что влечет за собой необходимость дополнительного учета конформации остатка Val^5 типа Q.

Фрагмент АТ 3—8. Для расчета энергий E фрагмента АТ 3—8 использовались данные расчета энергий E фрагмента АТ

Таблица 1.1

«Стартовые» конформации аминокислотных остатков,
входящих в состав молекулы ангиотензина*

Остаток	Остов	Боковая цепь				Конформации
		χ_1	χ_2	χ_3	χ_4	
Asp	B, R	60	90			B ₁ , R ₁
		60	-90			B ₂ , R ₂
		180	90			B ₃ , R ₃
		180	-90			B ₄ , R ₄
		-60	90			B ₅ , R ₅
		-60	-90			B ₆ , R ₆
Arg	B, R, L	60	180	180	90	B ₁ , R ₁ , L ₁
		60	180	180	-90	B ₂ , R ₂ , L ₂
		-180	180	180	90	B ₃ , R ₃ , L ₃
		-180	180	180	-90	B ₄ , R ₄ , L ₄
		-60	180	180	90	B ₅ , R ₅ , L ₅
		-60	180	180	-90	B ₆ , R ₆ , L ₆
Val	B, R, L	60				B ₁ , R ₁ , L ₁
		180				B ₂ , R ₂ , L ₂
		-60				B ₃ , R ₃ , L ₃
Tyr	B, R, L	60	90	90		B ₁ , R ₁ , L ₁
		180	90	90		B ₂ , R ₂ , L ₂
		-60	90	90		B ₃ , R ₃ , L ₃
His	B, L	60	90			B ₁ , L ₁
		60	-90			B ₂ , L ₂
		180	90			B ₃ , L ₃
		180	-90			B ₄ , L ₄
		-60	90			B ₅ , L ₅
		-60	-90			B ₆ , L ₆
Pro	B, R					B, R
Phe	B, L	60	90			B ₁ , L ₁
		180	90			B ₂ , L ₂
		-60	90			B ₃ , L ₃

* Обозначения конформаций остова соответствуют принятым обозначениям локальных минимумов потенциальных карт дипептидных единиц аминокислотных остатков; значения углов внутреннего вращения боковых цепей указаны в градусах.

Конформации молекулы ангиотензина

4—8 и результаты расчета энергий U дипептида Tyr-Val и трипептида Val-Tyr-Val. Эти данные позволили провести очередное ограничение возможных структур гексапептида АТ 3—8 за счет: а) конформаций дипептида Tyr⁴-Val⁵, которые, будучи включенными в структуру трипептида Val³-Tyr⁴-Val⁵, повышают значение соответствующих конформаций трипептида до 7—10 ккал/моль и в то же время повышают энергию E пентапептида АТ 4—8 на 7—10 ккал/моль; б) конформаций, в которых остаток Phe⁸ обладает $\chi_1 \sim 180^\circ$. По результатам расчета энергий E фрагмента АТ 3—8 можно выделить группу из 48 типов конформаций остова, стабильных по энергии ближних взаимодействий ($\Delta E \sim 10$ ккал/моль), и, кроме того, группу из 11 конформаций, удовлетворяющих критерию $\Delta E_1 \sim 17$ ккал/моль, для которых возможна стабилизация за счет дальних взаимодействий. Эти две группы структур описаны в табл. 1.2, где содержатся также результаты расчета их энергий U .

Таблица 1.2

Энергии E и U стабильных структур пептидного остова гексапептида АТ 3—8 при оптимальном расположении боковых цепей

Конформация						Энергия, ккал/моль	
Val ³	Tyr ⁴	Val ⁵	His ⁶	Pro ⁷	Phe ⁸	E	U
1	2	3	4	5	6	7	8

а. Конформации, стабильные по ближним взаимодействиям ($\Delta E < 10$ ккал/моль)

B ₂	B ₂	B ₂	B ₂	B	B ₃	-0,8	-1,6
R ₂	B ₂	B ₂	B ₂	B	B ₃	1,6	0,6
L ₂	B ₂	B ₂	B ₃	B	B ₃	4,9	4,0
B ₂	B ₂	B ₂	B ₃	B	L ₃	5,8	10,3
R ₂	B ₂	B ₂	B ₃	B	L ₃	8,7	13,0
B ₂	B ₂	B ₂	B ₂	R	L ₃	7,3	13,5
B ₂	B ₂	B ₂	B ₃	R	B ₃	-0,3	-1,3
B ₂	B ₂	B ₂	B ₃	R	B ₃	2,4	0,7
L ₂	B ₂	B ₂	B ₃	R	B ₃	5,7	4,2
B ₂	B ₂	B ₃	L ₃	Π	B ₃	2,4	-0,3
R ₂	B ₂	B ₃	L ₃	B	B ₃	4,8	2,4
L ₂	B ₂	B ₃	L ₃	B	B ₃	8,1	5,8
B ₂	B ₂	B ₃	L ₃	R	B ₃	5,8	5,5
R ₂	B ₂	B ₃	L ₃	R	B ₃	8,2	7,8
B ₂	B ₁	R ₂	B ₂	B	B ₃	2,0	-2,6
R ₂	B ₁	R ₂	B ₂	B	B ₃	3,3	-1,1
L ₂	B ₁	R ₂	B ₂	B	B ₃	6,5	2,1

Окончание таблицы 1.2

1	2	3	4	5	6	7	8
B ₂	B ₁	R ₂	B ₂	R	B ₃	2,8	0,4
R ₂	B ₁	R ₂	B ₂	R	B ₃	4,0	1,6
L ₂	B ₁	R ₂	B ₂	R	B ₃	7,3	5,1
B ₂	B ₃	Q ₃	B ₂	B	B ₃	1,4	-2,9
R ₂	B ₃	Q ₃	B ₂	B	B ₃	4,1	-0,3
L ₂	B ₃	Q ₃	B ₂	B	B ₃	6,0	6,3
B ₂	B ₃	Q ₃	B ₂	R	B ₃	1,7	1,0
R ₂	B ₃	Q ₃	B ₂	R	B ₃	4,4	3,6
L ₂	B ₃	Q ₃	B ₂	R	B ₃	6,3	5,9
B ₂	B ₃	L ₃	B ₂	B	B ₃	5,3	4,3
R ₂	B ₃	L ₃	B ₂	B	B ₃	7,7	4,1
B ₂	B ₃	L ₂	B ₂	R	B ₃	6,1	4,5
R ₂	B ₃	L ₂	B ₂	R	B ₃	8,4	5,1
B ₂	B ₂	Q ₃	L ₃	B	B ₃	6,2	4,7
R ₂	B ₂	Q ₃	L ₃	B	B ₃	8,6	7,2
B ₂	R ₃	B ₂	B ₂	B	B ₃	3,0	2,1
R ₂	R ₃	B ₂	B ₂	B	B ₃	4,6	3,6
L ₂	R ₃	B ₂	B ₂	B	B ₃	8,2	7,4
B ₂	R ₃	B ₂	B ₆	R	B ₁	3,3	2,6
R ₂	R ₃	B ₂	B ₆	R	B ₁	4,9	1,9
L ₂	R ₃	R ₂	B ₂	B	B ₃	8,5	8,2
B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	3,9	-6,7
R ₂	R ₃	R ₂	B ₂	B	B ₃	5,5	-0,7
L ₂	R ₃	R ₂	B ₂	R	B ₃	9,2	-3,0
B ₂	R ₃	R ₂	B ₂	R	B ₃	4,7	-1,9
R ₂	R ₃	B ₂	B ₃	R	B ₃	6,0	3,1
B ₂	L ₂	B ₂	B ₃	B	B ₃	6,7	4,4
B ₂	L ₂	R ₂	B ₂	B	B ₃	7,6	6,4
R ₂	L ₂	R ₂	B ₂	B	B ₃	7,2	2,6
B ₂	L ₂	R ₂	B ₂	R	B ₃	8,8	5,3
B ₂	L ₂	R ₂	B ₂	R	B ₃	7,9	4,6

6. Конформации, для которых возможна стабилизация за счет дальних взаимодействий (10 ккал/моль < ΔE < 17 ккал/моль)

B ₂	R ₂	L ₂	B ₂	R	B ₁	11,1	9,2
R ₂	R ₂	L ₂	B ₂	R	B ₁	12,4	10,4
L ₂	R ₂	L ₂	B ₂	R	B ₁	15,9	14,4
B ₂	B ₂	R ₂	L ₃	R	B ₁	14,1	13,4
B ₂	B ₂	B ₃	L ₃	B	L ₁	16,1	12,8
B ₂	B ₂	R ₂	B ₂	R	L ₂	15,7	12,8
R ₂	B ₁	R ₂	B ₃	R	L ₃	12,1	12,2
B ₂	B ₁	R ₂	B ₃	R	L ₃	13,3	13,3
R ₂	B ₂	B ₃	L ₃	R	L ₃	12,5	9,5
B ₂	B ₂	B ₃	L ₃	R	L ₃	14,9	12,1
B ₂	B ₂	R ₂	B ₃	B	L ₃	15,0	9,0

Конформации молекулы ангиотензина

Данные табл. 1.2 показывают, что во второй из рассматриваемых групп структур не наблюдается стабилизации какой-либо из конформаций: наименьшее значение ΔU в этом случае превосходит 15 ккал/моль. Далее следует отметить, что иерархия стабильностей конформаций остова гексапептида АТ 3—8, установленная по энергиям E , существенно изменяется: наиболее стабильными оказываются конформации остова типа XRRBBB (X — конформация остова остатка Val³), причем различия в величинах E и U для этих типов структур весьма велики: более 10 ккал/моль для конформации B₂R₃R₂B₂BB₃ (абсолютный минимум энергии U) и более 12 ккал/моль для конформации L₂R₃R₂B₂BB₃. Это обусловлено поворотом пептидного остова гексапептида почти на 180° и, следовательно, появлением сильных дисперсионных взаимодействий между остатками Val³ и Tyr⁴ и С-концевой частью молекулы. В конформации R остаток Val³ «отвернут» от С-концевого трипептида, что приводит к ослаблению указанных взаимодействий для конформации R₂R₃R₂B₃BB₃.

Следующими по стабильности типами структур остова фрагмента АТ 3—8 становятся конформации XBQBBB и XBRBBB, характеризующиеся изгибом остова в районе остатка Val⁵ и, следовательно, некоторым сближением N- и С-концевых частей гексапептида. Отметим, что для всех трех упомянутых типов структур перевод остатка Pro⁷ в конформацию R вызывает удаление остатка Phe⁸ от N-концевой части гексапептида, что проявляется в сравнительной дестабилизации соответствующих конформаций.

Очевидно, что в ряде конформаций гексапептида АТ 3—8, для которых вклад дальних взаимодействий существен, оптимальное расположение боковых цепей может отличаться от предполагаемого по данным расчета энергии E . В связи с этим была проведена дополнительная минимизация конформационной энергии U для следующих типов конформации остова АТ 3—8: XRRBBB, XRRBRB, XBQBRB, XBRBBB и XBRBRB при различных сочетаниях ротамеров боковых цепей (всего рассмотрено 52 структуры). В большинстве случаев варьирование конформаций боковых цепей вызывало повышение конформационной энергии; найденные оптимальные ротамеры боковых цепей указаны в табл. 1.2.

Полученные результаты в дальнейшем были использованы для поиска стабильных структур фрагмента АТ 2—8. Следует

отметить, что гексапептид АТ 3—8 является минимальным С-концевым фрагментом молекулы ангиотензина, для которого компактные структуры значительно более стабильны, чем вытянутые.

Фрагмент АТ 2—8. Появление в составе фрагмента АТ 2—8 наряду с ионогенной С-концевой карбоксильной группой (заряжена отрицательно, $pK \sim 3,4$ [189]) гуанидиновой группы остатка Arg^2 (заряжена положительно, $pK > 12$ [189]) значительно увеличивает возможность резкого возрастания вклада дальних взаимодействий: при пространственном сближении этих групп может возникнуть сравнительно устойчивая связь ионного типа [315] с энергией электростатических взаимодействий от -25 до -30 ккал/моль. Это обстоятельство, как уже отмечалось, существенно повышает роль ротамеров боковой цепи остатка Arg^2 в определении конформационной подвижности рассматриваемого фрагмента: ее исследование целесообразно начинать с изучения структур модельного гептапептида:



(замена остатков Val^3 и Val^5 аланинами вызвала бы нежелательное увеличение гибкости пептидной цепи; ниже всюду рассматривается лишь один ротамер боковой цепи валина: $\chi \sim -60^\circ$ для конформации Q остова остатка Val^5 и $\chi \sim 180^\circ$ во всех остальных случаях).

Поскольку предварительный расчет некоторых конформаций фрагмента АТ 2—8, полученных на основании наиболее стабильных структур фрагмента АТ 3—8, показал, что они обладают упомянутой связью ионного типа, дальнейшее рассмотрение проводилось лишь для 26 наиболее стабильных конформаций пептидного остова гексапептида АТ 3—8 ($\Delta U \sim 8$ ккал/моль). Для каждой из них учитывалось 6 возможных конформаций остатка Arg^2 (конформаций остова В и R, ротамеры боковой цепи $\chi_1 \sim 60, 180$ и -60° ; конформация остова L отличается от конформации В главным образом поворотом N-концевой пептидной группы, что, очевидно, не может повлиять на возможность образования связи ионного типа). Таким образом, на уровне модельного гексапептида проводилось рассмотрение примерно 150 структур.

Типы конформаций остова модельного гексапептида, удовлетворяющие критерию $\Delta U \sim 10$ ккал/моль, были положены в

Конформации молекулы ангиотензина

основу проведенного расчета структур фрагмента АТ 2—8; к ним добавлены также некоторые конформации АТ 2—8, для которых образование квазициклических структур с устойчивой связью ионного типа происходит лишь на уровне полного фрагмента АТ 2—8 (например, структура BLRRBBB). Ротамеры боковых цепей остатков Tyr⁴ и His⁶ выбирались в соответствии с результатами, полученными на уровне гексапептида АТ 3—8; ротамер бокового радикала Phe⁸ в большинстве случаев обладал значениями угла внутреннего вращения $\chi_1 \sim 60$ и -60° . В ряде случаев наряду с конформацией В остова остатка Arg² рассматривалась также конформация L. Наиболее стабильные конформации гексапептида АТ 2—8 ($\Delta U \sim 10$ ккал/моль) приведены в табл. 1.3.

Набор структур табл. 1.3 содержит все низкоэнергетические конформации остова гексапептида АТ 3—8 (за исключением структур BBBBVB и BBBLBB); в то же время все структуры

Таблица 1.3

Стабильные конформации АТ 2—8

Конформация							Энергия, ккал/моль
Arg ²	Val ³	Tyr ⁴	Val ⁵	His ⁶	Pro ⁷	Phe ⁸	
R ₁	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-30,7
R ₄	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-36,0
R ₅	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-26,6
B ₄	L ₂	R ₃	R ₂	B ₂	B	B ₃	-30,7
R ₁	B ₂	R ₃	R ₂	B ₂	R	B ₁	-26,3
R ₄	B ₂	R ₃	R ₂	B ₂	R	B ₃	-28,7
B ₄	B ₂	R ₃	R ₂	B ₂	R	B ₁	-30,7
B ₅	L ₂	R ₃	R ₂	B ₂	R	B ₃	-30,5
B ₄	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-30,2
B ₆	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-28,9
R ₅	L ₂	R ₃	R ₂	B ₂	B	B ₁	-32,7
B ₁	B ₂	B ₁	R ₂	B ₂	B	B ₁	-27,3
B ₄	B ₂	B ₁	R ₂	B ₂	B	B ₁	-30,4
B ₆	B ₂	B ₁	R ₂	B ₂	B	B ₁	-28,7
B ₄	B ₂	B ₃	R ₂	B ₃	R	B ₄	-29,1
B ₄	B ₂	B ₃	Q ₃	B ₂	R	B ₃	-27,6
L ₆	B ₂	B ₁	R ₂	B ₂	B	B ₃	-27,6
R ₄	R ₂	R ₃	R ₂	B ₂	R	B ₃	-29,5
B ₄	B ₂	B ₂	B ₂	B ₃	R	B ₃	-26,1
B ₃	R ₂	B ₂	B ₂	B ₃	R	B ₁	-28,8
B ₆	R ₂	B ₂	B ₂	B ₃	R	B ₃	-30,5

табл. 1.3 относятся к числу квазициклических, допускающих образование связи ионного типа $\text{Arg}^2\text{—C-концевой карбоксил}$. Это обстоятельство указывает на высокую степень согласованности внутримолекулярных взаимодействий в молекуле ангиотензина. Можно отметить также, что конформации BRRRBBV , RBRRBBV и BLRRBBV пептидного остова фрагмента AT 2—8 «предпочитают» ротамер боковой цепи остатка Phe^8 с $\chi_1 \sim -60^\circ$, а конформации BBRRBBV и LBRRBBV — $\chi_1 \sim 60^\circ$. В остальных случаях оба ротамера предпочтительны, по существу, в одинаковой степени.

Молекула AT 1—8. Расчет конформационной энергии U . Поиск набора стабильных структур молекулы AT 1—8 проводился с использованием результатов табл. 1.3 и при учете данных расчета дипептида $\text{Asn}^1\text{—Arg}^2$ (рассматривалась цвиттерионная форма молекулы). Наличие в составе AT 1—8 остатка Asn^1 и заряженной N-концевой аминогруппы не нарушает основную пространственную характеристику наиболее стабильных структур молекулы — квазициклическость, но вызывает их дальнейшую дифференциацию по конформационной энергии. Табл. 1.4 содержит 10 структур молекулы AT 1—8 , отобранных по критерию $\Delta U \sim \sim 10$ ккал/моль (значения углов внутреннего вращения 9 структур приводились в сообщениях [27, 316]) с учетом проведенного варьирования конформаций боковых цепей.

Таблица 1.4

Конформационные энергии наиболее стабильных типов конформаций пептидного остова молекулы ангиотензина (без учета варьирования боковых цепей и свободной энергии гидратации)

Конформация								Энергия, ккал/моль
Asn^1	Arg^2	Val^3	Tyr^4	Val^5	His^6	Pro^7	Phe^8	
B_3	R_1	B_2	R_3	R_2	B_3	B	B_3	—34,8
B_3	R_4	B_2	R_3	R_2	B_3	B	B_3	—36,8
B_3	R_5	B_2	R_3	R_2	B_3	B	B_3	—40,4
B_3	B_4	L_2	R_3	R_2	B_2	B	B_3	—37,7
B_3	B_4	B_2	R_3	R_2	B_2	R	B_1	—36,4
B_3	B_6	L_2	R_3	R_2	B_2	R	B_3	—38,4
B_3	B_4	B_2	R_3	R_2	B_3	B	B_3	—32,6
B_2	R_5	L_2	R_3	R_2	B_2	B	B_3	—31,8
B_2	B_4	B_2	B_1	R_2	B_2	B	B_1	—32,0
B_2	B_4	B_2	B_3	R_2	B_3	R	B_3	—32,1

Молекула АТ 1—8. Учет энергии гидратации. Расчет свободной энергии гидратации молекулы АТ 1—8 проводился с помощью алгоритма, описанного в [177]; при этом предполагалось, что воздействие молекул растворителя не может существенно увеличить стабильность структур, невыгодных с точки зрения внутримолекулярных взаимодействий. Энергия гидратации $U_{\text{гидр}}$ и полная энергия молекулы $U_{\text{общ}} = U + U_{\text{гидр}}$ рассчитывались для структур, приведенных в табл. 1.4; при этом разброс значений $U_{\text{гидр}}$ колебался в пределах 10 ккал/моль, что служит дополнительным оправданием для ограничения набора стабильных структур молекулы с помощью критерия $\Delta U \sim \sim 10$ ккал/моль, поскольку маловероятно, что для какой-нибудь из структур, не вошедших в табл. 1.4, возможно снижение $U_{\text{гидр}}$ на 8—10 ккал/моль. В то же время расчет показал, что одна из структур табл. 1.4 — BRLRRBBB существенно дестабилизируется и может быть исключена из числа наиболее стабильных структур остова молекулы ($\Delta U_{\text{общ}} \sim 15$ ккал/моль).

Таким образом, учет энергии гидратации позволяет выделить группу из шести типов наиболее стабильных конформаций остова молекулы ангиотензина: BRBRRBBB, BBLRRBBB, BBVRRBBB, BBLRRBRB, BBBBRBBB, BBBBRBRB.

Молекула АТ 1—8. Варьирование конформаций боковых цепей. При рассмотрении возможных конформаций боковых цепей в различных структурах остова молекулы АТ 1—8 учитывался факт пространственной удаленности (в большинстве случаев) боковых цепей остатков Asn¹ и Tyr⁴ от остатков His⁶ и Phe⁸; это позволяет, в частности, считать энергетический эффект изменения конформаций боковой цепи гистидина практически аддитивным. Кроме того, помимо варьирования конформаций боковой цепи в конформации В остова остатка Asn¹ рассматривалась также конформация R остова этого остатка. Поскольку переход В→R для остатка Asn¹ означает лишь поворот бокового радикала и N-концевой аминоксиппы вокруг связи N—C^α, не следует, по-видимому, считать структуры молекулы с конформацией R остова остатка Asn¹ особыми типами структуры пептидного остова.

Конформация остова BRBRRBBB. Из трех вариантов указанных структур, соответствующих ротамерам боковой цепи остатка Arg² с $\chi_1 \sim 60^\circ$, -170° и -60° , последний представляет наиболее низкоэнергетические конформации молекулы ангиотензина. Поворот пептидной группы на 180° в районе остатков

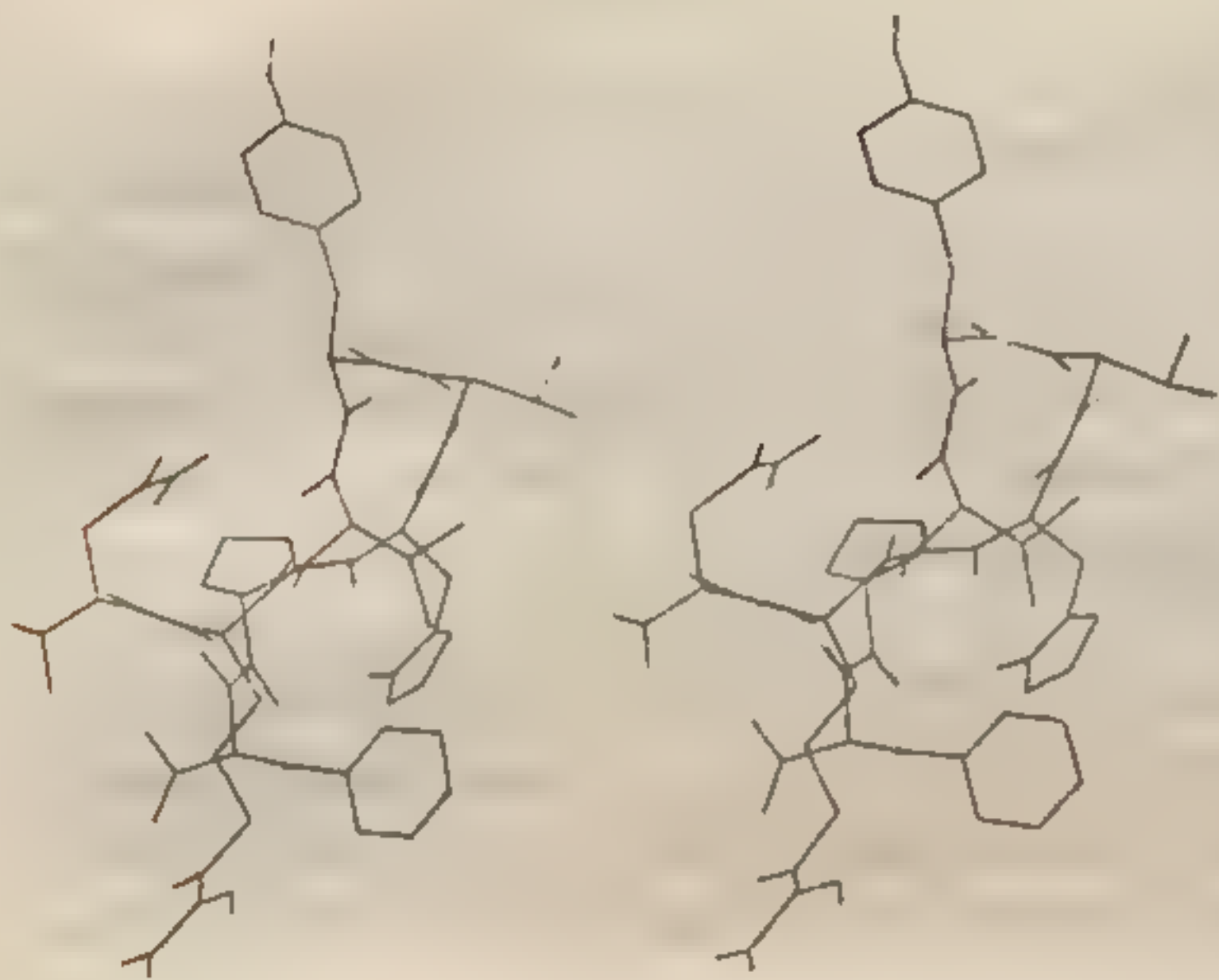


Рис. 1.9. Стереорисунок молекулы ангиотензина в конформации пептидного остова BRBRRBBV.

Tyr⁴ и Val⁵ дополняется в этих структурах изгибом цепи в районе остова остатка Arg², так что остова молекулы напоминает несколько изогнутую шпильку (размерами 17 × 12 Å), сближенные концы которой «замыкаются» боковой цепью остатка Arg² (рис. 1.9).

Квазициклические структуры с $\chi_1 \sim -170^\circ$ остатка Arg² характеризуются заметным увеличением межконцевых расстояний, а структуры с

Таблица 1.5

Варьирование конформаций боковых цепей молекулы ангиотензина при конформации остова BRBRRBBV

Конформация								Энергия, ккал/моль		
Asn ¹	Arg ²	Val ³	Tyr ⁴	Val ⁵	His ⁶	Pro ⁷	Phe ⁸	U	U _{общ}	ΔU _{общ}
B ₃	R ₁	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-34,8	-54,7	12,3
B ₃	R ₄	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-36,8	-61,3	5,7
B ₃	R ₅	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-40,4	-65,5	1,5
B ₂	R ₄	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-39,3	-63,3	3,7
B ₅	R ₄	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-40,0	-66,0	1,0
B ₆	R ₄	B ₂	R ₃	R ₂	B ₂	B	B ₃	-38,0	-64,6	2,4
B ₃	R ₄	B ₂	R ₂	R ₂	B ₃	B	B ₃	-33,4	-60,0	7,0
B ₃	R ₆	B ₂	R ₁	R ₂	B ₃	B	B ₃	-40,2	-61,8	5,3
B ₂	R ₅	B ₂	R ₂	R ₂	B ₃	B	B ₃	-36,8	-58,9	8,2
B ₃	R ₅	B ₂	R ₂	R ₂	B ₃	B	B ₃	-39,8	-64,8	2,2
B ₃	R ₅	B ₂	R ₂	R ₂	B ₃	B	B ₃	-43,4	-66,2	0,8
B ₄	R ₅	B ₂	R ₂	R ₂	B ₃	B	B ₃	-43,5	-67,0	0,0
B ₅	R ₅	B ₂	R ₂	R ₂	B ₃	B	B ₃	-41,1	-66,9	0,1
B ₄	R ₅	B ₂	R ₂	R ₂	B ₂	B	B ₃	-37,2	-62,0	5,1
B ₃	R ₅	B ₂	R ₂	R ₂	B ₆	B	B ₃	-36,8	-58,9	8,2
B ₂	R ₅	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-37,1	-64,0	3,1
B ₅	R ₅	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-40,2	-66,8	0,3
R ₂	R ₄	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-37,4	-60,5	6,5
R ₂	R ₅	B ₂	R ₂	R ₂	B ₃	B	B ₃	-26,2	-49,4	17,6

$\chi_1 \sim 50^\circ$ остатка Arg^2 заметно уступают по энергии наиболее стабильным конформациям описываемого типа.

Результаты варьирования конформаций боковых цепей приведены в табл. 1.5, из которой видно, что абсолютный минимум энергии $U_{\text{общ}}$ соответствует конформации с $\chi_1 \sim 180^\circ$ остатка Tyr^4 (при $\chi_1 \sim -60^\circ$ остатка Arg^2). Перевод боковой цепи Tyr^4 в конформацию с $\chi_1 \sim -60^\circ$

вызывает некоторое увеличение энергии U , которое, однако, компенсируется снижением энергии $U_{\text{гидр}}$. Кольца остатков His^6 , Pro^7 и Phe^8 пространственно сближены, и их дисперсионные взаимодействия являются дополнительным фактором стабилизации. В структурах с $\chi_1 \sim -170^\circ$ остатка Arg^2 основные свойства боковых цепей остаются теми же; исключение составляет лишь параллельное расположение боковых цепей остатков Asn^1 и Tyr^4 , вследствие которого конформация с $\chi_1 \sim -60^\circ$ несколько более предпочтительна для остатка Tyr^4 .

Конформация остова BBLRRBBV. Конформация этого типа отличается от описанных выше (с $\chi_1 \sim -170^\circ$ остатка Arg^2) лишь поворотом на 180° плоскости пептидной группы между остатками Arg^2 и Val^3 (рис. 1.10). Поворот этой группы несколько повышает энергию U , однако форма пептидной цепи и свойства боковых цепей (табл. 1.6) в обоих типах конформации остова весьма сходны (за исключением некоторой предпочтительности конформации B_2 для остатка His^6).

Конформация остова BBBRRBBV. Данная конформация пептидного остова также в главных деталях сходна с двумя предыдущими (рис. 1.11). Несмотря на то что спрямление N-концевого плеча шпильки ведет к некоторому увеличению ее размеров и уменьшению комплектности структуры, варьирование конформаций боковых цепей (табл. 1.7) дает результаты, аналогичные описанным выше. Несколько более предпочтитель-

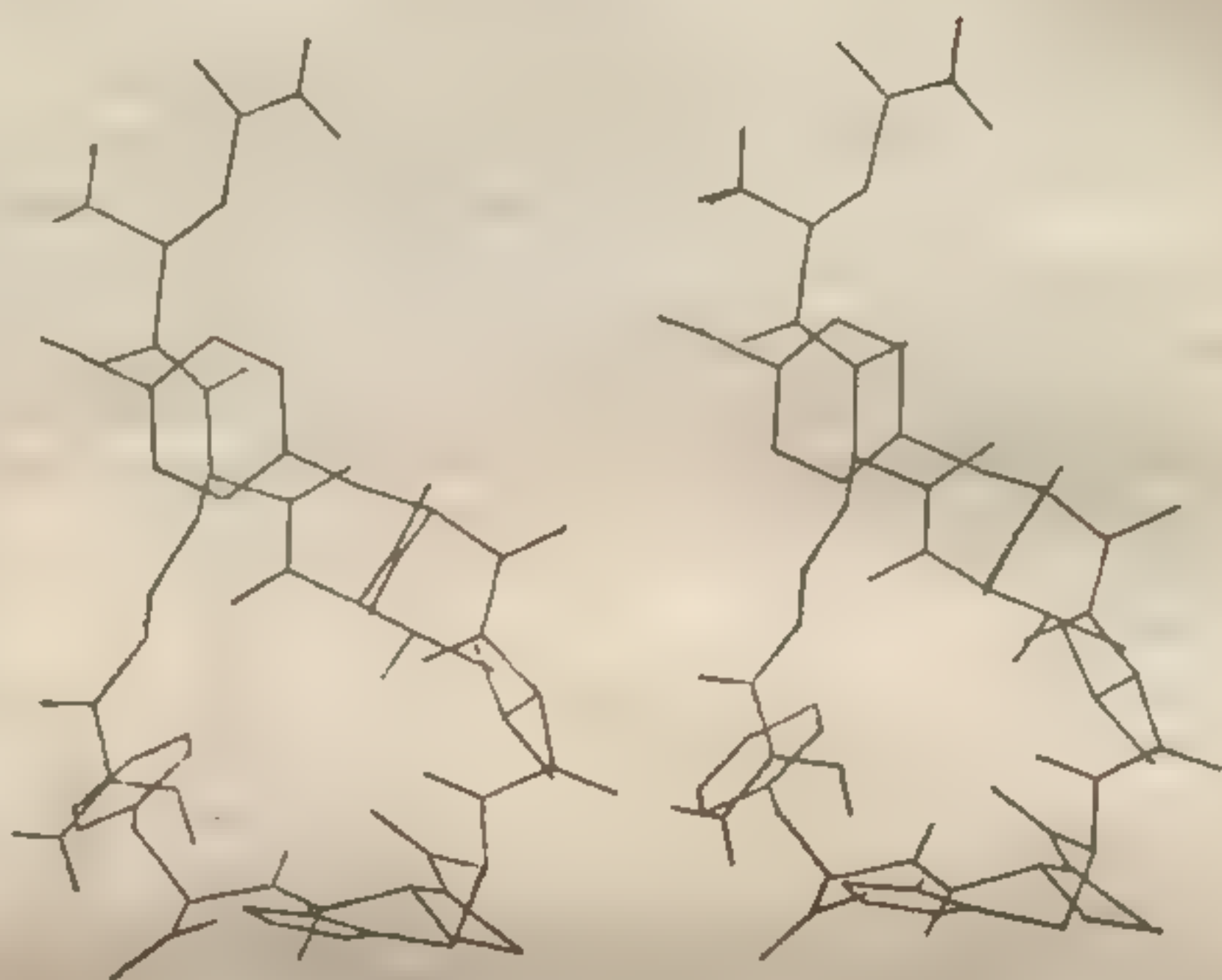
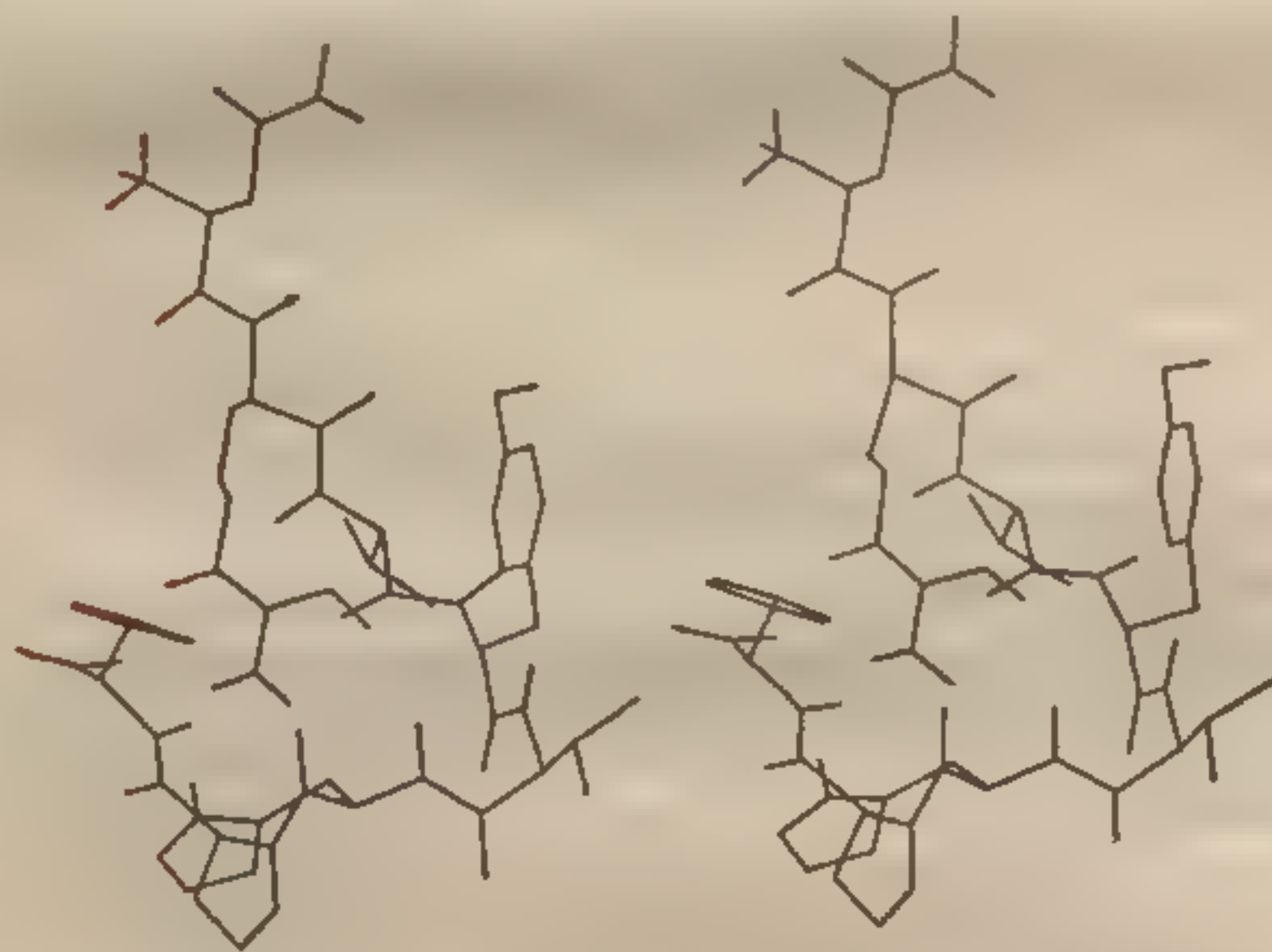


Рис. 1.10. Стереорисунок молекулы ангиотензина в конформации пептидного остова BBLRRBBV.

Таблица 1.6

Варьирование конформаций боковых цепей молекулы ангиотензина при конформации остова BBLRRBBB

Конформация								Энергия, ккал/моль		
Asn ¹	Arg ²	Val ³	Tyr ⁴	Val ⁵	His ⁶	Pro ⁷	Phe ⁸	<i>U</i>	<i>U</i> _{общ}	ΔU _{общ}
B ₃	B ₄	L ₂	R ₃	R ₂	B ₂	B	B ₃	-37,7	-62,5	4,5
B ₂	B ₄	L ₂	R ₃	R ₂	B ₂	B	B ₃	-33,7	-61,0	7,1
B ₅	B ₄	L ₂	R ₃	R ₂	B ₂	B	B ₃	-35,5	-64,2	2,9
B ₃	B ₄	L ₂	R ₁	R ₂	B ₂	B	B ₃	-32,4	-57,2	9,8
B ₃	B ₄	L ₂	R ₂	R ₂	B ₂	B	B ₃	-30,1	-58,3	9,7
B ₃	B ₄	L ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-36,5	-61,8	5,3
R ₂	B ₄	L ₂	R ₃	R ₂	B ₂	B	B ₃	-35,8	-61,3	5,7



ными оказываются здесь структуры с $\chi_1 \sim -60^\circ$ остатка Tyr⁴, а изменение конформации боковой цепи остатка His⁶ приводит к существенному повышению энергии.

Рис. 1.11. Стереорисунок молекулы ангиотензина в конформации пептидного остова BBBRRBBB.

Таблица 1.7

Варьирование конформаций боковых цепей молекулы ангиотензина при конформации остова BBBRRBBB

Конформация								Энергия, ккал/моль		
Asn ¹	Arg ²	Val ³	Tyr ⁴	Val ⁵	His ⁶	Pro ⁷	Phe ⁸	<i>U</i>	<i>U</i> _{общ}	ΔU _{общ}
B ₃	B ₄	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-32,6	-60,1	7,0
B ₅	B ₄	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-31,1	-61,1	5,9
B ₂	B ₄	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-32,6	-60,4	6,7
B ₂	B ₆	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-30,7	-59,7	7,4
B ₂	B ₄	B ₂	R ₁	R ₂	B ₃	B	B ₃	-27,9	-54,3	12,8
B ₂	B ₄	B ₂	R ₂	R ₂	B ₃	B	B ₃	-30,9	-58,2	8,9
B ₂	B ₄	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-21,3	-49,6	17,4
B ₂	B ₄	B ₂	R ₃	R ₂	B ₃	B	B ₃	-29,2	-56,7	11,4

Конформации молекулы ангиотензина

Конформация остова BBLRRBRB.

Дополнительный изгиб пептидной цепи, обусловленный конформацией R остатка Pro⁷, несколько увеличивает расстояние между гуанидиновой группой остатка Arg² и С-концевым карбоксилем, ослабляя связь ионного типа. Однако дополнительная стабилизация конформации остова достигается за счет образования водородной связи между аминогруппой остатка Val³ и карбонилем остатка His⁶ (рис. 1.12). Результаты варьирования боковых цепей (табл. 1.8) указывают на то, что в этом случае боковая цепь остатка Phe⁸ обладает значительной конформационной подвижностью; некоторая конформационная свобода свойственна также боковым

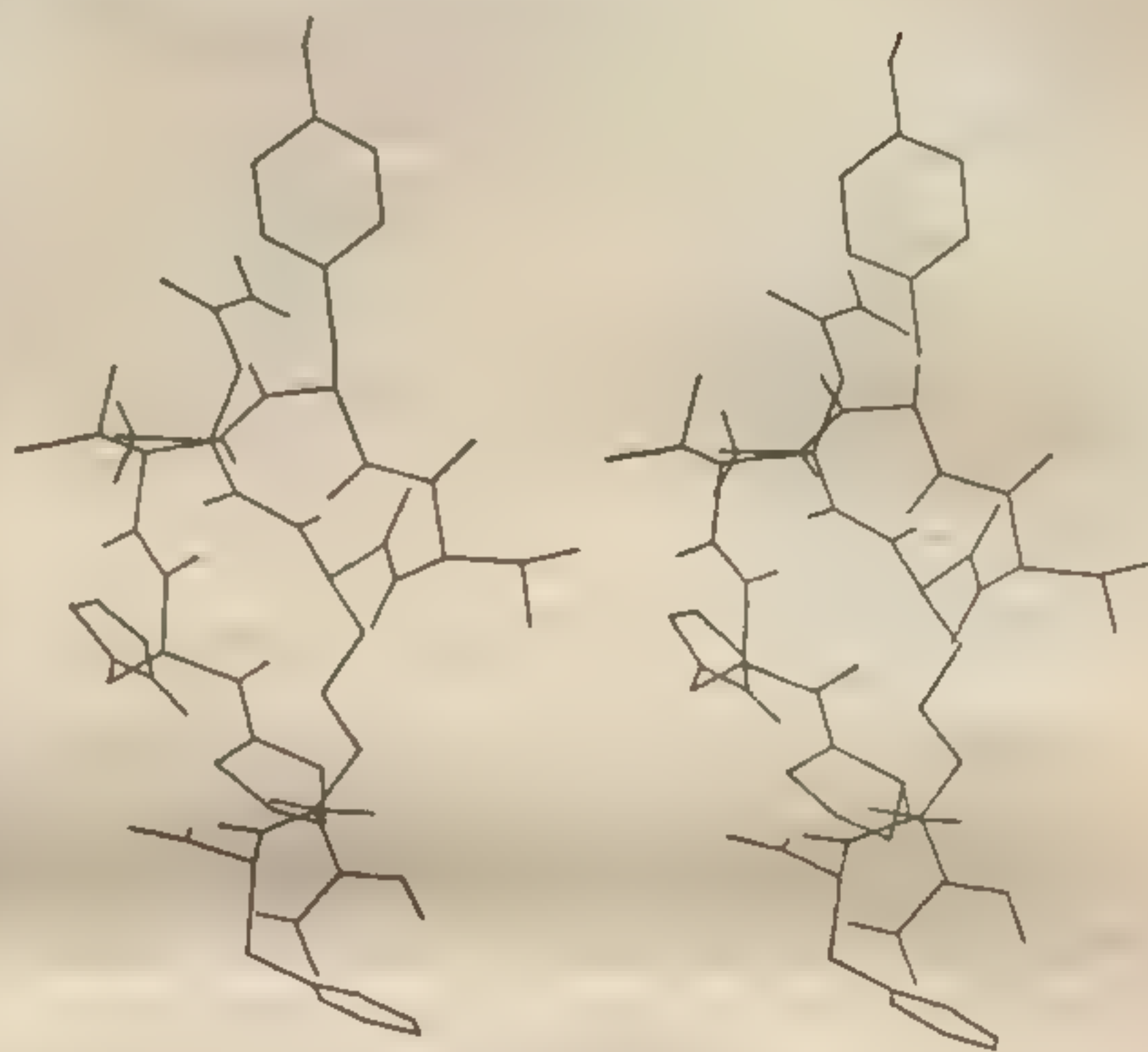


Рис. 1.12. Стереорисунок молекулы ангиотензина в конформации пептидного остова BBLRRBRB.

Таблица 1.8

Варьирование конформаций боковых цепей молекулы ангиотензина при конформации остова BBLRRBRB

Конформация								Энергия, ккал/моль		
Asn ¹	Arg ²	Val ³	Tyr ⁴	Val ⁵	His ⁶	Pro ⁷	Phe ⁸	<i>U</i>	<i>U</i> _{общ}	ΔU _{общ}
B ₃	B ₆	L ₂	R ₃	R ₂	B ₂	R	B ₃	-38,4	-56,4	10,8
B ₂	B ₆	L ₂	R ₃	R ₂	B ₂	R	B ₃	-30,1	-48,5	18,6
B ₅	B ₆	L ₂	R ₃	R ₂	B ₂	R	B ₃	-37,6	-57,5	9,5
B ₃	B ₄	L ₂	R ₁	R ₂	B ₂	R	B ₃	-32,8	-51,4	15,7
B ₃	B ₆	L ₂	R ₂	R ₂	B ₂	R	B ₃	-38,8	-57,4	9,6
B ₅	B ₆	L ₂	R ₂	R ₂	B ₂	R	B ₃	-38,4	-58,7	8,3
B ₃	B ₆	L ₂	R ₂	R ₂	B ₃	R	B ₃	-32,6	-53,3	13,8
B ₃	B ₆	L ₂	R ₂	R ₂	B ₆	R	B ₃	-27,5	-51,4	15,7
B ₅	B ₆	L ₂	R ₂	R ₂	B ₂	R	B ₂	-35,6	-56,6	10,5
B ₅	B ₆	L ₂	R ₃	R ₂	B ₂	R	B ₁	-35,7	-56,0	11,0

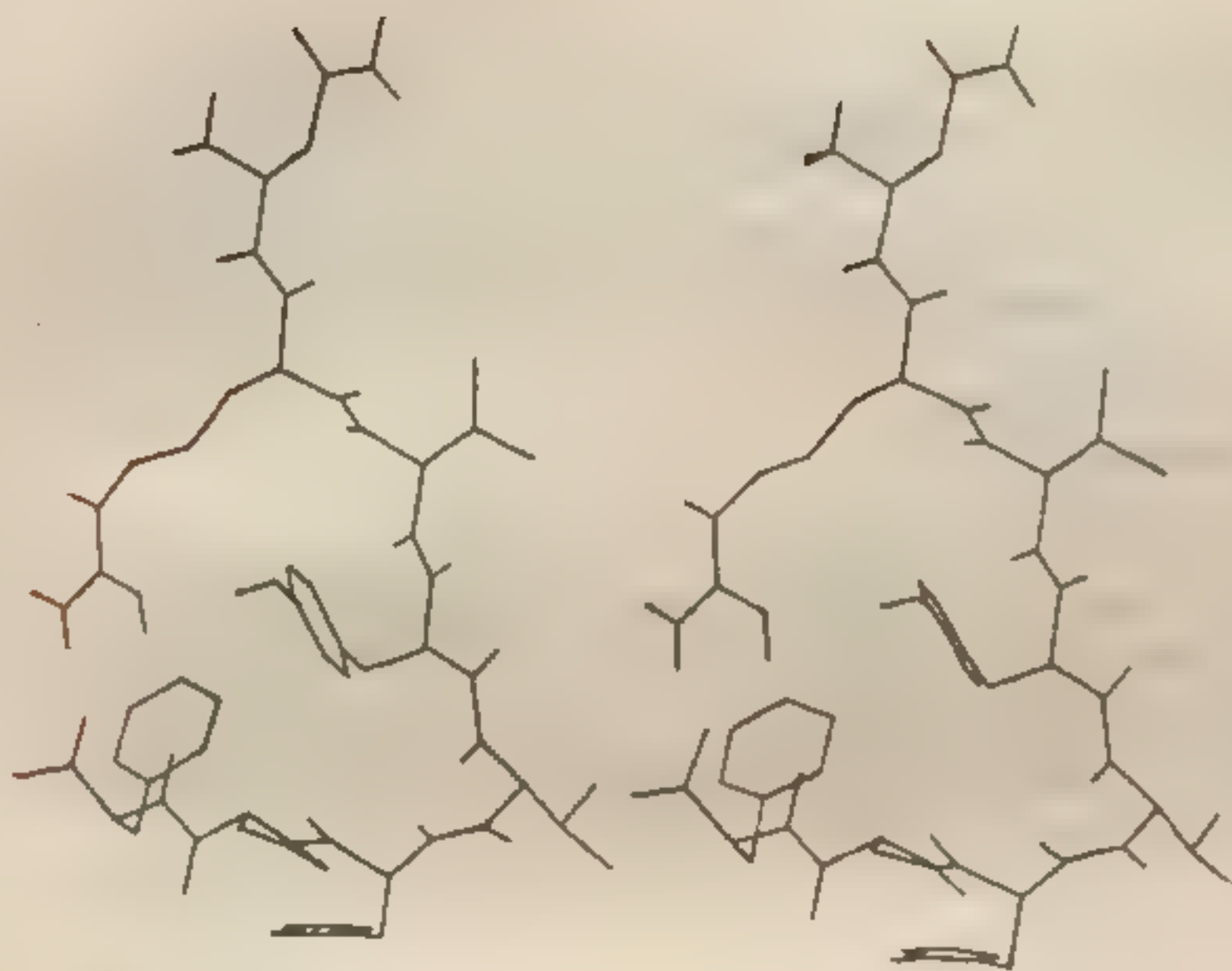


Рис. 1.13. Стереорисунок молекулы ангиотензина в конформации пептидного остова BVBRRBVB.

(рис. 1.13). Дисперсионные взаимодействия колец остатков Phe⁸ и Tyr⁴ делают конформацию боковой цепи последнего с $\chi_1 \sim 50^\circ$ значительно более предпочтительной при любых конформациях боковой цепи гистидина (кроме области с $\chi_1 \sim 80^\circ$ остатка His⁶). Далее, результаты варьирования расположения боковых цепей показывают (табл. 1.9), что изменение конформации боковой цепи остатка Asn¹ практически не сказывается на стабильности молекулы в целом.

Конформация остова BVBRRBVB. По форме пептидной цепи эта конформация напоминает предыдущую, несмотря на то что

цепям остатков Tyr⁴, His⁶ и Asn¹ (за исключением конформаций с $\chi_1 \sim 60^\circ$ остатка Asn¹).

Конформация остова BVBRRBVB. Конформация R остова остатка Val⁵ создает изгиб цепи на 90° так, что общие очертания молекулы напоминают деформированный прямоугольник с «размерами» $\sim 10 \times 16 \text{ \AA}$, стороны которого составляют дипептиды Asn¹-Arg², Val³-Tyr⁴, His⁶-Pro⁷ и боковая цепь остатка Arg²

Таблица 1.9

Варьирование конформаций боковых цепей молекулы ангиотензина при конформации остова BVBRRBVB

Конформация								Энергия, ккал/моль		
Asn ¹	Arg ²	Val ³	Tyr ⁴	Val ⁵	His ⁶	Pro ⁷	Phe ⁸	<i>U</i>	<i>U</i> _{общ}	$\Delta U_{\text{общ}}$
B ₂	B ₄	B ₂	B ₁	R ₂	B ₂	B	B ₁	-32,0	-56,3	10,8
B ₃	B ₄	B ₂	B ₁	R ₂	B ₂	B	B ₁	-31,2	-55,6	11,5
B ₅	B ₄	B ₂	B ₁	R ₂	B ₂	B	B ₁	-30,8	-37,0	10,0
B ₂	B ₄	B ₁	B ₁	R ₂	B ₃	B	B ₁	-30,1	-53,6	13,5
B ₂	B ₄	B ₂	B ₃	R ₂	B ₂	B	B ₁	-27,4	-50,9	16,2
B ₂	B ₄	B ₂	B ₂	R ₂	B ₃	B	B ₁	-19,8	-44,8	22,3

Конформации молекулы ангиотензина

дополнительный изгиб остова в районе остатка Pro⁷ удаляет боковую цепь остатка Phe⁸ от боковой цепи остатка Tyr⁴ (рис. 1.14). С другой стороны, как убеждают данные табл. 1.10, существует некоторая корреляция конформаций боковых цепей остатков His⁶ и Tyr⁴ и His⁶ и Phe⁸. Наибольшей конформационной подвижностью в этом случае обладает боковая цепь остатка Asn¹.

Таким образом, средствами полуэмпирического конформационного анализа удалось выделить ограниченный набор конформаций молекулы ангиотензина в водном растворе. Указанный набор

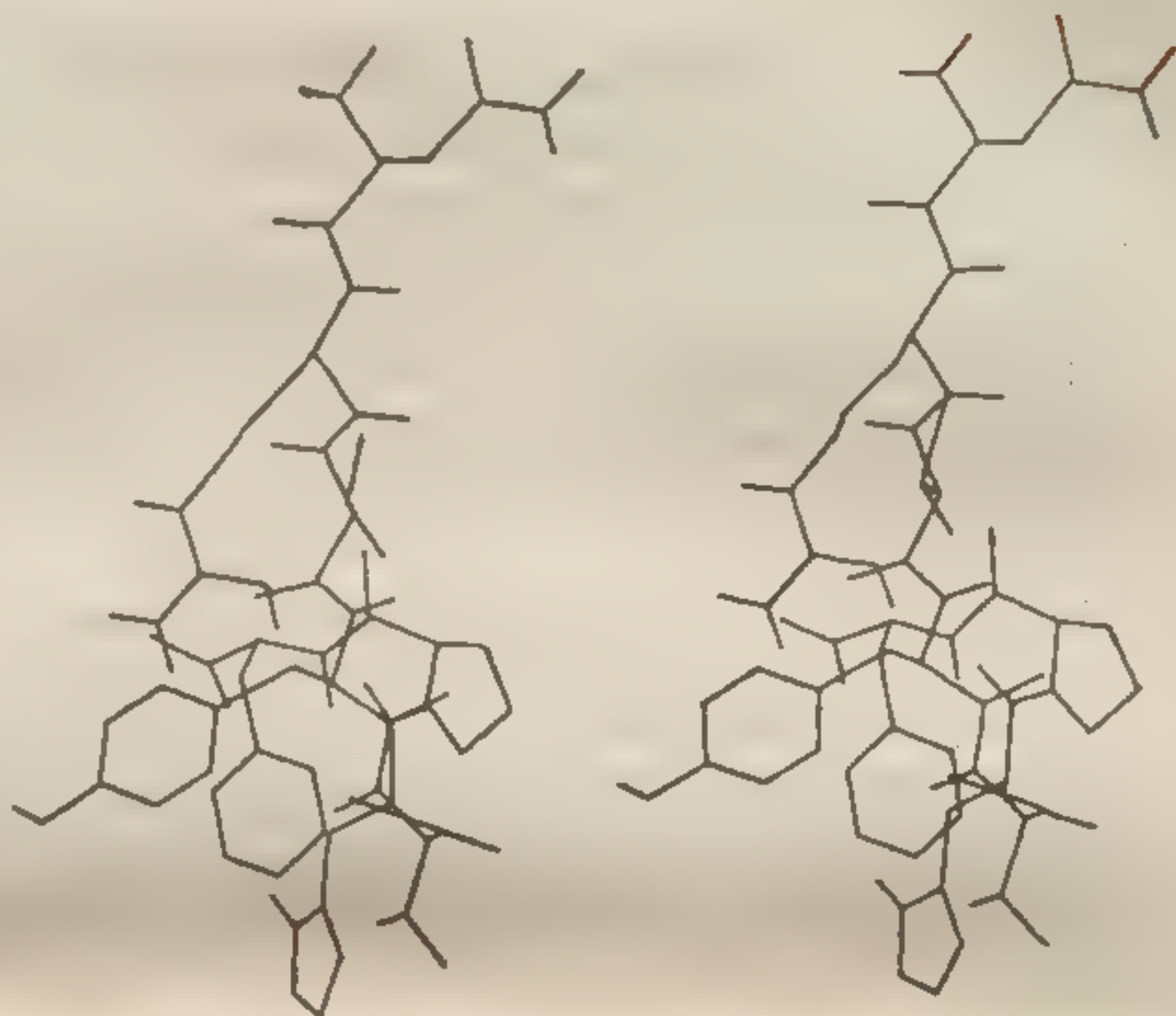


Рис. 1.14. Стереорисунок молекулы ангиотензина в конформации пептидного остова BBBBBRBRB.

Таблица 1.10

Варьирование конформаций боковых цепей молекулы ангиотензина при конформации остова BBBBBRBRB

Конформация								Энергия, ккал/моль		
Asn ¹	Arg ²	Val ³	Tyr ⁴	Val ⁵	His ⁶	Pro ⁷	Phe ⁸	<i>U</i>	<i>U</i> _{общ}	$\Delta U_{общ}$
B ₂	B ₄	B ₂	B ₃	R ₂	B ₃	R	B ₃	-32,1	-54,5	12,5
B ₂	B ₄	B ₂	B ₃	R ₂	B ₆	R	B ₃	-32,6	-54,7	12,4
B ₂	B ₄	B ₂	B ₃	R ₂	B ₆	R	B ₃	-30,0	-54,3	12,8
B ₂	B ₃	B ₂	B ₁	R ₂	B ₂	R	B ₃	-21,9	-47,3	19,8
B ₂	B ₄	B ₂	B ₁	R ₂	B ₃	R	B ₃	-22,3	-49,3	17,8
B ₂	B ₄	B ₂	B ₁	R ₂	B ₁	R	B ₃	-25,1	-52,2	14,9
B ₂	B ₄	B ₂	B ₂	R ₂	B ₃	R	B ₃	-31,1	-54,2	12,8
B ₂	B ₄	B ₂	B ₂	R ₂	B ₃	R	B ₃	-30,5	-55,2	11,8
B ₂	B ₄	B ₂	B ₁	R ₂	B ₃	R	B ₁	-19,6	-45,2	21,8
B ₂	B ₄	B ₂	B ₁	R ₂	B ₆	R	B ₁	-26,0	-51,2	15,9
B ₂	B ₄	B ₂	B ₂	R ₂	B ₆	R	B ₁	-31,8	-54,9	12,1
B ₂	B ₄	B ₂	B ₂	R ₂	B ₆	R	B ₁	-31,3	-54,0	13,1
B ₆	B ₄	B ₂	B ₂	R ₂	B ₆	R	B ₁	-30,2	-55,9	11,2
B ₂	B ₄	B ₂	B ₃	R ₂	B ₃	R	B ₁	-29,0	-51,2	15,8

включает в себя шесть типов конформаций пептидного остова молекулы (значения углов внутреннего вращения конформаций с оптимальным расположением боковых цепей для каждого типа структуры остова приведены в табл. 1.11; эти же конформации изображены на рис. 1.9—1.14), причем для трех наиболее низкоэнергетических конформаций — BRBRRBBB,

Таблица 1.11

Значения углов внутреннего вращения наиболее стабильных типов структуры остова молекулы ангиотензина с оптимальным расположением боковых цепей (в градусах)

Оста-ток	Угол	BRBRRBBB	EBLRRBBB	BBBRRBBB	BBLRRBRB	BBBVRBBB	BBBVRBRB
Asn	φ	-133	-131	-140	-135	-136	122
	ψ	128	151	147	145	136	152
	χ ₁	180	-61	-60	-60	-60	-61
	χ ₂	-89	88	89	89	90	86
	χ ₃						
Arg	φ	-112	-124	-131	-88	-143	-124
	ψ	-42	150	148	153	120	134
	χ ₁	-70	-149	-165	-94	-139	-167
	χ ₂	-173	-176	-162	-176	172	180
	χ ₃	-159	-173	171	175	-177	173
	χ ₄	102	-134	-90	-144	-98	-106
	χ ₅						
Val	φ	-122	58	-113	50	-126	-116
	ψ	138	113	144	33	124	103
	χ ₁	-174	-179	-174	-169	-179	-178
Tyr	φ	-74	-116	-95	-148	-157	-154
	ψ	-39	-48	-36	-50	165	158
	χ ₁	-179	-51	-63	-165	49	-134
	χ ₂	85	93	94	87	88	84
	χ ₃	90	92	92	90	93	90
Val	φ	-57	-119	-59	-112	-100	-73
	ψ	-40	-46	-30	-46	-32	-29
	χ ₁	171	-179	172	180	-179	175
His	φ	-152	-134	-126	-140	-129	-108
	ψ	124	151	135	140	136	144
	χ ₁	-169	55	-168	47	63	-56
	χ ₂	-71	61	-74	80	86	87
Pro	ψ	128	156	119	-40	119	-25
Phe	φ	-141	-128	-142	-134	-153	-116
	ψ	144	157	142	140	159	161
	χ ₁	-84	-74	-86	-65	78	51
	χ ₂	105	91	99	98	103	84

Конформации молекулы ангиотензина

BBLRRBBV и BBRRBBV сходны практически все основные пространственные характеристики.

Фактором, повышающим стабильность описанных структур, является, как упоминалось, наличие связи ионного типа между гуанидиновой группой остатка Arg² и С-концевой карбоксильной группой, которая возникает при квазициклизации. Важно отметить, однако, что наличие особенности такого рода не противоречит всей системе внутримолекулярных взаимодействий, а, наоборот, поддерживается и предопределяется ею. Это обстоятельство хорошо иллюстрирует рис. 1.15, на котором иерархия относительных стабильностей основных типов конформаций остова (при оптимальных конформациях боковых цепей) представлена как функция эффективной диэлектрической проницае-

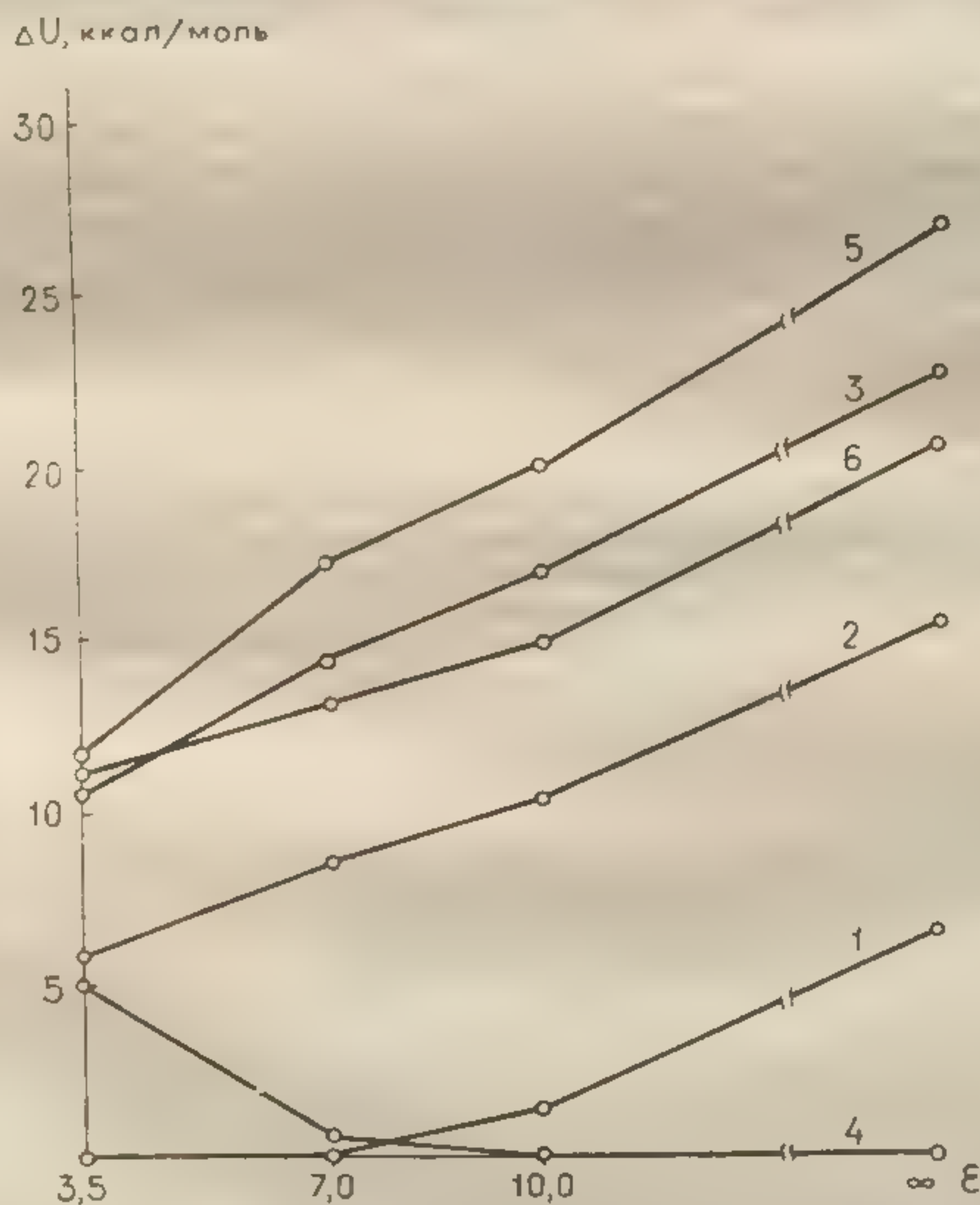


Рис. 1.15. Эффект ослабления электростатических взаимодействий для наиболее стабильных конформаций остова молекулы ангиотензина. Цифрами на рисунке обозначены конформации: 1 — BRRRBBV, 2 — BBLRRBBV, 3 — BBRRBBV, 4 — BBLRRBRV, 5 — BBBRRBBV, 6 — BBBRRBRV.

мости среды ϵ . Заметим, что относительная стабильность большинства структур изменяется с ростом ϵ незначительно. Исключение составляет лишь существенная стабилизация с ростом ϵ конформаций типа BBLRRBRB. Кривые рис. 1.15 получены пропорциональным снижением вклада электростатического взаимодействия $\text{Arg}^2\text{—}[\text{NHC—}(\text{NH}_2)_2]^+\text{...—OOC—Phe}^8$ в конформационную энергию, полученную минимизацией при $\epsilon=3,5$. Очевидно, эта оценка является лишь мажорантной; точные значения могут быть получены минимизацией конформационной энергии при каждом значении ϵ . Такая процедура была проведена для предельного случая, представляющего наибольший интерес, — полного исключения электростатического вклада, что соответствует деионизации одной из взаимодействующих групп. Результаты, относящиеся к наиболее стабильным из рассмотренных в этом расчете конформаций молекулы, приводятся в табл. 1.12. Прежде всего следует отметить резкое снижение энергетической дифференциации различных типов конформаций остова: максимальное значение ΔU для 15 структур, приведенных в табл. 1.12, составляет 5,6 ккал/моль, причем среди наиболее стабильных оказываются все выделенные в настоящем разделе квазициклические структуры молекулы. Кроме того, весьма

Таблица 1.12
Наиболее стабильные конформации пептидного остова молекулы ангиотензина (случай деионизации ионогенных групп)

Конформация								ΔU , ккал/моль
Asn ¹	Arg ²	Val ³	Tyr ⁴	Val ⁵	His ⁶	Pro ⁷	Phe ⁸	
B	B ₄	L	R	R	B	B	B	0,0
B	B ₄	B	R	R	B	B	B	0,8
B	B ₃	R	B	R	B	B	B	0,8
B	B ₄	B	R	R	B	R	B	1,4
B	R ₄	B	R	R	B	B	B	1,7
B	R ₄	B	R	R	B	R	B	2,0
B	B ₄	R	R	R	B	B	B	2,3
B	B ₄	B	B	R	B	R	B	3,3
B	B ₆	L	R	R	B	R	B	3,5
B	B ₄	R	R	B	B	B	B	3,6
B	B ₄	B	R	B	B	B	B	3,9
B	R ₅	B	R	R	B	B	B	4,5
B	B ₄	B	B	R	B	B	B	4,6
B	B ₄	B	R	B	B	R	B	4,6
B	B ₆	B	R	R	B	B	B	5,6

стабильными оказываются также некоторые структуры, не допускающие квазициклизации; в первую очередь это относится к конформации остова BBRBRBBB ($\Delta U = 0,8$ ккал/моль).

Подробно описанное в настоящем разделе исследование конформационной подвижности боковых цепей молекулы ангиотензина показало, что в наибольшей мере ею обладают боковые цепи остатков Asn¹, Tyr⁴ и Phe⁸; подвижность боковой цепи фенилаланина оказывается коррелированной с конформацией остатка Pro⁷ и является максимальной в случае конформации R этого остатка. Конформацией остатка Pro⁷ во многом определяется также конформационная свобода боковой цепи гистидина: в структурах с конформацией B остатка Pro⁷ группа NH имидазольного кольца гистидина вовлечена, как правило, в водородную связь с карбонилем остатка Pro⁷. С другой стороны, конформации боковых цепей остатков Val³ и Val⁵ практически полностью определяются их локальными стерическими условиями.

В дополнение к сказанному следует отметить, что описанная выше расчетная процедура представляет интерес и в методическом отношении, особенно в сопоставлении с предпринятой в последнее время попыткой тотального расчета молекулы ангиотензина [117]. Авторы этой работы проводили предварительное ограничение числа возможных конформаций пептидного остова молекулы на основании так называемого приближения стереоалфавита [254], в котором совокупность возможных конформаций остова определяется стабильностью всевозможных комбинаций шести стандартных конформаций остова аминокислотных остатков, входящих в состав молекулы, причем минимизация потенциальной энергии не проводится. Такой подход, очевидно, приводит к необоснованному исключению из рассмотрения тех структур, для которых стерические напряжения, имеющие место при стандартных значениях углов внутреннего вращения, легко устраняются на первых же этапах минимизации потенциальной энергии; в то же время именно такие структуры наиболее компактны и, следовательно, наиболее стабильны с точки зрения дисперсионных взаимодействий. Однако основная ошибка авторов работы [117] заключается, по-видимому, в выборе октапептида (Ala)₆-Pro-Ala в качестве модельного фрагмента для дальнейшего ограничения набора стабильных конформаций остова ангиотензина. Исключение из рассмотрения боковой цепи остатка Arg² привело к тому, что основными факторами, стабили-

зирующими пространственную структуру модельного фрагмента, оказались внутримолекулярные водородные связи и электростатические взаимодействия ионогенных концевых групп. В сочетании с приближением стереоалфавита и довольно «жестким» энергетическим критерием ($\Delta U \sim 8$ ккал/моль) для отбора стабильных конформаций модельного фрагмента это привело к результатам, которые не могли быть исправлены последующим введением боковых цепей: среди 20 наиболее стабильных типов структур пептидного остова молекулы ангиотензина, полученных в [117], оказалась лишь одна из шести предлагаемых в настоящем разделе (конформация BBVBRBRB). Естественно, что после минимизации потенциальной энергии этих 20 конформаций указанная структура оказалась наиболее низкоэнергетической. Тем не менее полученное нами оптимальное расположение боковых цепей для этой структуры не было найдено в [117]. Можно, таким образом, заключить, что результаты работы [117] определяются искусственными факторами, ведущими свое происхождение от производных модельных и расчетных допущений, и, следовательно, не могут дать исчерпывающей информации о полном наборе стабильных конформаций молекулы ангиотензина.

1.3. СОПОСТАВЛЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ И РАСЧЕТНЫХ СВЕДЕНИЙ О СТРУКТУРЕ АНГИОТЕНЗИНА

Задачей настоящего раздела является, по существу, не пассивное сличение экспериментальных и расчетных результатов, а совместная их интерпретация. Предпринятый расчет позволяет выделить круг стерически состоятельных структур, среди которых наверняка окажутся и самые стабильные, наиболее характерные для молекулы ангиотензина в растворе, однако получаемые энергетические оценки не позволяют с надежностью охарактеризовать статистические веса отдельных структур [9]. Несомненно, лишь часть описанных в предыдущем разделе конформаций представлена в растворе с заметным статистическим весом, причем, с учетом различных факторов неопределенности, присущих экспериментальным методам, радикальное разделение описанного спектра конформаций или, тем более, установление индивидуальных заселенностей оказывается не-

возможным. Тем не менее даже качественные суждения подобного рода могут представить значительный интерес.

Экспериментальные данные о пространственной структуре молекулы ангиотензина сгруппированы ниже по методам, с помощью которых они были получены.

Диализ на тонких пленках. Скорость диффузии молекул через тонкие мембраны позволяет судить (при отсутствии адсорбции) о сравнительной компактности молекулярной структуры при различных рН и ионной силе растворителя. В случае заметных изменений скорости диффузии при варьировании этих величин можно также сделать предположения об отклонении общей формы молекулы от наиболее компактной и о конкретных причинах, обусловивших такое отклонение. Очевидно, этот метод не дает возможности делать выводы относительно деталей пространственной структуры молекулы.

Снижение скорости диффузии через тонкие пленки при переходе к рН $\sim 10,7$ наблюдалось лишь в одном эксперименте по диализу ангиотензина [148], причем впоследствии эти данные не были подтверждены [146]. Кроме того, в работах [107, 146] не отмечалось заметных изменений скорости диффузии АТ при варьировании ионной силы и рН растворителя; единственное исключение составляет замеченное в [146] преобладание более «быстрой» компоненты АТ при рН, близких 2,1 и 11,0, т. е. при нейтрализации электростатического заряда С-концевого карбоксилата или гуанидиновой группы остатка Arg². (По интерпретации авторов [146], их результаты свидетельствуют о наличии в растворе двух одинаково стабильных структур молекулы АТ с разной скоростью диффузии через мембрану; остается неясным, однако, каким образом удастся заметить различную скорость диффузии этих двух «компонент», которые, будучи одинаково стабильными, должны находиться в динамическом равновесии по обе стороны мембраны.)

Таким образом, единственным результатом работ по диализу ангиотензина [107, 146, 148] можно, по-видимому, считать тривиальный вывод о сравнительной компактности его пространственной структуры.

Титрование. Определение констант диссоциации ионогенных групп молекулы методами потенциометрического титрования (см., например, [189]), а также титрованием с использованием средств ¹³С-, ¹Н-ЯМР- [158, 182] и КД-спектроскопии [104, 317] дает возможность не только проанализировать распределение

электростатических зарядов на различных функциональных группах молекулы, но и выявить некоторые детали пространственной структуры. Так, при титровании ряда аналогов пептида, полученных замещением тех или иных функциональных групп, можно, сравнивая константы диссоциации одной и той же функциональной группы в различных аналогах, интерпретировать заметное различие этих констант как указание на сближенность данной функциональной группы с группой, подвергшейся замещению в данном аналоге (при этом, разумеется, предполагается, что произведенное замещение не отразилось в значительной степени на наборе стабильных конформаций молекулы). Кроме того, по изменениям константы данной функциональной группы в зависимости от pH и ионной силы растворителя можно судить о наличии или отсутствии взаимодействия этой группы с растворителем; последнее может, в частности, означать вовлечение данной группы во внутримолекулярные водородные или солевые связи, а также указывать на ее расположение «внутри» пространственной молекулярной структуры, т. е. позволяет предположить ограничение пространственной подвижности рассматриваемой группы.

Константы диссоциации всех ионогенных групп молекулы ангиотензина (за исключением гуанидиновой), а также целого ряда ее аналогов и гомологов в водном растворе получены методом потенциометрического титрования [189]; результаты этой работы хорошо согласуются с данными более раннего исследования [233], а также титрования с помощью средств ^{13}C -, ^1H -ЯМР- [158, 182] и КД-спектроскопии [104, 317]. Это позволяет рассматривать выводы работ [104, 158, 182, 189, 233, 317] в отношении пространственной структуры молекулы как вполне достоверные. К таким выводам можно отнести следующие:

1. N- и C-концевые группы молекулы расположены на более близком расстоянии, чем в состоянии статистического клубка.
2. Между имидазольным кольцом остатка His⁶ и C-концевой карбоксильной группой ион-дипольное взаимодействие отсутствует.
3. Фенольная группа остатка Tyr⁴ взаимодействует (по крайней мере, частично) с растворителем.
4. Сопоставление констант диссоциации C-концевой карбоксильной группы в случае аналогов [Gly¹]-AT и [Gly¹, Gly²]-AT [189] показывает, что наличие гуанидиновой группы облегчает диссоциацию C-концевого карбоксила. Это обстоятельство

можно также интерпретировать как указание на сближенность этих двух групп.

Водородно-дейтериевый и водородно-третий обмен. Метод основан на измерении скорости обмена отдельных протонов молекулы с растворителем, содержащим изотопы водорода — дейтерий или тритий. Соответственно различают обычно водородно-третий или водородно-дейтериевый обмен; последний регистрируется также средствами ^1H -ЯМР-спектроскопии. Интерпретация результатов, получаемых с помощью изучения кинетики изотопного обмена, практически не отличается от интерпретации результатов титрования: низкие скорости обмена определенных протонов могут указывать на их вовлечение во внутримолекулярную водородную связь или экранирование от растворителя, а высокие — на наличие контакта с растворителем. Недостатком метода является ограниченная воспроизводимость результатов; во многих случаях данные кинетики изотопного обмена, полученные различными авторами, различаются довольно существенно, что, конечно, снижает их интерпретационную ценность. Так, в работах по экспериментальному исследованию кинетики изотопного обмена в молекуле ангиотензина [84, 106, 158, 180, 233, 249] (в том числе с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии [84, 106, 158]) имеются заметные расхождения в оценке скоростей обмена амидных протонов. В работе [233] утверждается, что скорости обмена всех амидных протонов молекулы (6 атомов) примерно одинаковы, причем ни один из них не вовлечен в водородную связь. Однако данные исследования [249] говорят в пользу предположения о доступности амидного протона остатка Arg^2 растворителю, в то время как два других протона (в более поздних работах [84, 106] их относят к остаткам Val^3 и Val^5) вовлечены во внутримолекулярные водородные связи. С другой стороны, авторы [158], подтверждая данные о высокой скорости обмена амидного протона остатка Arg^2 , приходят к выводу о том, что единственным протоном остова молекулы с существенно пониженной скоростью обмена является амидный протон остатка Phe^8 . Наконец, результаты работы [180] интерпретируются как указание на наличие в остова молекулы трех «структурированных», двух «промежуточных» и одного «быстрого» протона (следует отметить, что растворителем в экспериментах [180] служила не вода, как в случаях, упомянутых выше, а трифторэтанол). Тот же результат (обнаружение 2,35 «быстрого» амидного протона

в молекуле ангиотензина в трифторэтаноле) получен в работе [253].

Большее взаимное согласие экспериментальных результатов наблюдается в случае оценки скоростей обмена неамидных протонов молекулы. Высокой скоростью обмена обладают, по мнению авторов [158, 249], протоны α -аминогруппы, боковой цепи остатка Asn¹, а также гуанидиновой группы остатка Arg². К аналогичным выводам приходят и авторы работы [296], в которой возможный контакт протонов молекулы с растворителем исследовался с помощью эффекта Оверхаузера; в этой же работе, кроме того, отмечается подверженность влиянию растворителя амидного протона остатка Arg².

Итак, данные экспериментов по кинетике изотопного обмена позволяют утверждать следующее:

1. Один или два амидных протона, локализованных в гексапептиде АТ 3—8, экранированы от влияния растворителя и/или вовлечены во внутримолекулярную водородную связь.

2. Амидный протон остатка Arg², протоны боковых цепей остатков Arg² и Asn¹, а также α -аминогруппы доступны растворителю и не вовлечены в водородные связи.

Дисперсия оптического вращения (ДОВ) и круговой дихроизм (КД). Как отмечалось в [230], высокая чувствительность этих методов к изменениям пространственной структуры пептидов является одной из причин широкого их применения, однако именно это свойство чрезвычайно затрудняет интерпретацию спектров ДОВ и КД (в случае нерегулярных структур), почти полностью лишая их предсказательной силы. В самом деле, совпадение спектров исследуемого пептида и модельного соединения еще не может служить доказательством идентичности их пространственных структур, поскольку остается неизвестным, как именно связано изменение спектров с изменениями пространственной, а тем более валентной структуры молекулы. По той же причине нельзя с достоверностью утверждать, что различие спектров двух разных соединений означает существенное различие их пространственных структур.

Интерпретацию спектров ДОВ и КД можно получить лишь в случае четкой идентификации регулярных структур (α -спирали, β -структуры и т. д.) либо в случае исследования спектров одного и того же соединения в различных растворителях. Другие же эффекты, например расщепление полосы, соответствующей переходу $\pi \rightarrow \pi^*$, на два компонента с противополож-

ными знаками, которое может свидетельствовать о пространственной сближенности пептидных хромофоров, могут быть надежно интерпретированы лишь в результате решения общей проблемы соответствия данного КД-спектра различным пространственным структурам молекулы. Однако такая задача в отношении пептидов, содержащих около десятка аминокислотных остатков, в настоящее время все еще далека от практической реализации [205].

В большинстве работ по ДОВ- и КД-спектроскопии ангиотензина и его аналогов [102, 104, 145, 233, 317] не обнаружено элементов регулярных структур у этой молекулы: исключение составляет лишь работа [57], в которой результаты ДОВ-спектроскопии расцениваются как доказательство наличия α -спиральной структуры молекулы (в некоторой степени нарушаемой наличием остатка Pro⁷). Эта интерпретация полностью опровергается авторами последующих исследований по ДОВ- и КД-спектроскопии ангиотензина. Так, в работе [233] утверждается, что молекула, скорее, находится в состоянии статистического клубка, а в [102, 104, 145, 317] указывается на возможность наличия в молекуле изгиба типа антипараллельной β -структуры («кросс- β -форма»).

Инфракрасная (ИК) и рамановская спектроскопия. Благодаря высокой чувствительности полос, обусловленных группами NH, к их вовлечению в водородные связи, изучение ИК-спектров пептида в неводных растворителях может использоваться для установления системы внутримолекулярных водородных связей. Возможно, далее, достаточно надежное различение по виду спектров *цис*- и *транс*-конформации вторичных амидных группировок [230]. В некоторых случаях с помощью ИК- и рамановской спектроскопии удастся идентифицировать наличие параллельной и антипараллельной β -структуры (последняя иногда называется также «кросс- β -структура» или «кросс- β -форма» [102, 104, 317]). Именно такой результат дало исследование ангиотензина и ряда его фрагментов [71]. Этот результат согласуется с данными спектроскопии КД; можно, по-видимому, считаться с наличием в структуре молекулы изгиба типа «кросс- β -формы», причем вероятность наличия такой структуры увеличивается при переходе от водного растворителя к органическим.

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и флуоресцентный анализ. Включение в состав валентной структуры молекулы спиновых или флуоресцентных меток

дает возможность определять сближенность тех или иных частей молекулы и даже проводить количественную оценку средних расстояний между ними [278, 315]. Таким образом, рассматриваемые методы являются весьма привлекательными с точки зрения получения более детальных характеристик пространственной структуры молекулы; к сожалению, точность оценки внутримолекулярных расстояний ограничивается здесь не только определенным произволом ■ интерпретации результатов эксперимента, но и тем обстоятельством, что функциональные группы, расстояния между которыми подлежат оценке, обладают, как правило, довольно значительной конформационной свободой и, следовательно, речь может идти лишь о расстояниях, усредненных по набору стабильных ротамеров. Кроме того, следует считаться также с нарушением набора стабильных конформаций исследуемого соединения в результате включения в него, например, громоздкой дансильной группы [315].

Единственным случаем использования средств ЭПР-спектроскопии для исследования пространственной структуры ангиотензина явилась работа [330], результаты которой послужили основой для описанной выше (см. раздел 1.1) модели структуры молекулы, предполагающей ион-дипольное взаимодействие $(\text{His}^6)\text{NH}^+ \dots -\text{OOC}(\text{Phe}^8)$. Флюоресцентный анализ молекулы ангиотензина был проведен в [279] для случая аналога $[\text{Trp}^1]\text{-AT}$; расстояние между боковыми цепями остатков ■ положениях 1 и 4 составляет, по оценке [279], менее 8 Å.

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Спектроскопия ЯМР относится к числу методов, дающих наиболее полную информацию о пространственной структуре пептидов; в этом смысле ЯМР уступает лишь рентгеноструктурному анализу. Общий вид спектра ЯМР несет информацию о числе возможных конформеров пептида, их относительном содержании и симметрии. Температурные зависимости химических сдвигов групп NH позволяют определить вовлечение этих групп во внутримолекулярные водородные связи. Значения вицинальных констант $^3J(\text{H}-\text{N}-\text{C}^\alpha-\text{H})$, определяемые из спектров ^1H -ЯМР, связаны со значениями двугранного угла Θ между плоскостями $\text{H}-\text{N}-\text{C}^\alpha$ и $\text{N}-\text{C}^\alpha-\text{H}$ [258] (рис. 1.16), а констант $^3J(^{15}\text{N}-\text{C}^\alpha-\text{C}-\text{H})$ — со значениями двугранного угла Θ_1 между плоскостями $^{15}\text{N}-\text{C}^\alpha-\text{C}$ и $\text{C}^\alpha-\text{C}-\text{H}$ [80, 292] (см. рис. 1.16); последняя зависимость, однако, изучена в гораздо меньшей степени. От значений угла Θ (см. рис. 1.16) зависит также величина вицинальной константы

$^3J(^{13}\text{C}-\text{C}-\text{H})$ боковых цепях пептидов между плоскостями оценены с помощью [230].
Следует отметить, что ментальных данных. Так, например, при изучении зависимости конформации молекулы от температуры этого процесса. Полезна информация из данных ^{13}C -ЯМР, являющаяся надежным методом для определения конформации пептидов. Возможность изучения конформационных изменений при различных температурах. Выводы, сделанные на основании спектроскопических данных, хорошо согласуются с данными рентгеновской кристаллографии.



$^3J(^{13}C'-NC^{\alpha}-H)$. Величины углов внутреннего вращения в боковых цепях пептидной молекулы (например, двугранный угол между плоскостями $H-C^{\alpha}-C^{\beta}$ и $C^{\alpha}-C^{\beta}-H$) также могут быть оценены с помощью соответствующих вицинальных констант [230].

Следует отметить, что корректная интерпретация экспериментальных данных, приведенных выше, во многом затруднена. Так, например, пониженные значения величины $d\delta/dT$, характеризующей зависимость химического сдвига данного протона молекулы от температуры, могут указывать также и на экранирование этого протона от влияния растворителя; обсуждению этого вопроса посвящена, в частности, работа [91].

Полезную информацию о структуре можно получить также из данных ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, которая является единственным надежным методом, позволяющим различать *транс*- и *цис*-конформации пептидной группы пролина; кроме того, она дает возможность изучения времен спин-решеточной релаксации, которые можно интерпретировать в терминах относительной подвижности различных частей молекулы пептида.

Выводы, сделанные авторами различных работ по ^{13}C -ЯМР-спектроскопии ангиотензина [104, 105, 124, 182, 312], в целом хорошо согласуются друг с другом. Так, из данных этих работ

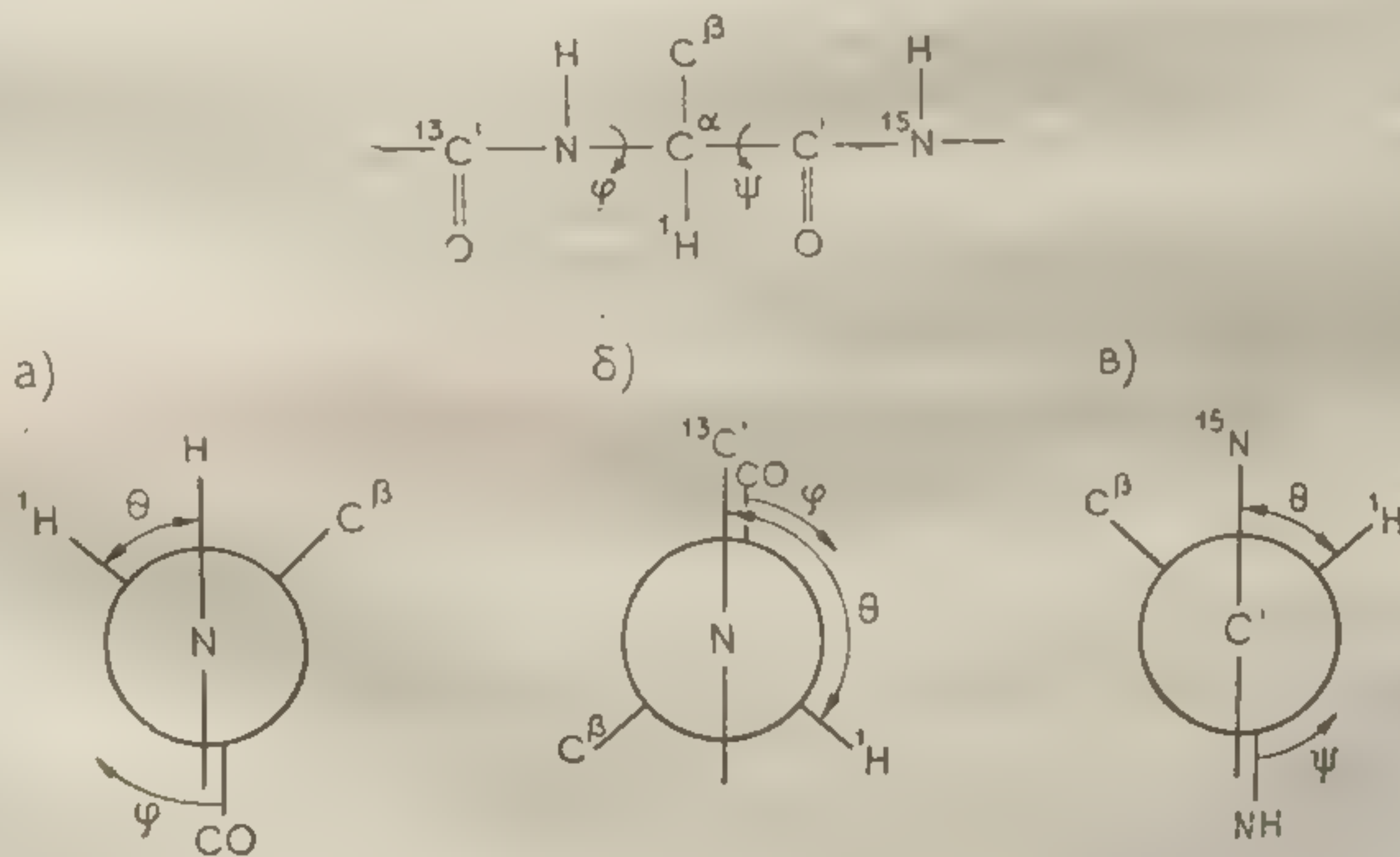


Рис. 1.16. Связь между углами внутреннего вращения пептидного остова и углом Θ для различных типов ЯМР-спектроскопии: а — 1H -ЯМР-спектроскопия, б — ^{13}C -ЯМР-спектроскопия, в — ^{15}N -ЯМР-спектроскопия.

следует, что пептидная связь His⁶-Pro⁷ имеет *транс*-конформацию (5—10% *цис*-изомеров согласно [104], другие авторы приводят более высокие оценки — около 20 [124] и 16% [312]), а боковая цепь остатка Phe⁸ обладает сравнительно высокой подвижностью. Кроме того, в работе [104] указано, что С-концевая часть молекулы вовлечена во внутримолекулярные взаимодействия, а данные работы [105], рассматривавшей спинрешеточную релаксацию, отмечают высокую подвижность боковой цепи остатка Tyr⁴ и ограниченную конформационную подвижность боковой цепи остатка Arg². Наконец, в этой же работе приведена оценка среднего радиуса молекулы ангиотензина — 8 Å.

Следует отметить, что в работе [104] содержатся также сведения о температурной зависимости химических сдвигов амидных водородов тетрапептида Asp-Arg-Val-Tyr, которые можно истолковать как указание на существование водородных связей с участием групп NH остатков Arg, Val и Tyr. Вряд ли, однако, можно вслед за авторами постулировать сохранение этой системы водородных связей в целой молекуле гормона, тем более что ¹H-ЯМР-спектры указанного тетрапептида были получены не для случая водного раствора — растворителем служил диметилсульфоксид.

В ряде работ [104, 106, 123, 159, 225] были установлены также значения вицинальных констант ³J(N—NC^α—H) для молекулы ангиотензина, хорошо совпадающие друг с другом. Однако определение деталей пространственной структуры гормона на основании этих констант затрудняется тем обстоятельством, что обычная интерпретация значений вицинальных констант с помощью уравнения Карплуса

$$J(\text{H—NC}^{\alpha}\text{—H}) = A \cos^2 \Theta - B \sin \Theta + C \sin^2 \Theta$$

(Θ — двугранный угол между плоскостями H—N—C^α и N—C^α—H; $\Theta = \varphi - 60^\circ$) уже дает для молекулы ангиотензина (6 констант) возможность выбора примерно из 4000 допустимых структур, поскольку это уравнение имеет до четырех решений.

Помимо этого обстоятельства, существует также определенное принципиальное затруднение в сопоставлении экспериментальных значений вицинальных констант ³J(H—NC^α—H) со значениями, вычисленными на основании набора углов внутреннего вращения φ молекулы, предлагаемого той или иной мо-

делью пространственной структуры. Дело в том, что экспериментальное значение $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$ является величиной, усредненной по набору углов φ , соответствующих различным стабильным структурам молекулы. В то же время для каждого угла внутреннего вращения в каждой конкретной структуре можно, в принципе, указать область значений, в пределах которой этот угол может изменяться без существенного повышения потенциальной энергии молекулы. Так, например, у аминокислотного остатка, имеющего в полипептидной цепи конформацию остова R, значения угла φ , как правило, довольно свободно варьируют в пределах от -120 до -55° . Заметим теперь, что такой области изменения угла φ соответствуют, согласно уравнению Карплуса с параметрами, предложенными в [258], значения вицинальной константы $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$ от 2,5 до 10,9 Гц.

Иными словами, при сопоставлении расчетных результатов с экспериментом усредненное экспериментальное значение вицинальной константы $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$ будет сравниваться с теоретическим значением, по существу, произвольно выбранным из области 2,5—10,9 Гц, поскольку значениям $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$ из этой области соответствуют конформации с почти одинаковой потенциальной энергией, лежащие в пределах одного и того же локального энергетического минимума.

Таким образом, можно сформулировать следующие принципы корректного сопоставления экспериментальных значений вицинальных констант с предполагаемой пространственной структурой молекулы:

1. Для аминокислотных остатков, имеющих различные конформации остова, можно указать допустимые области значений $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$ (в Гц):

конформация остова B : $6,7 < ^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}) < 10,9$;

конформация остова R : $2,5 < ^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}) < 10,9$;

конформация остова L : $6,5 < ^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}) < 8,7$.

2. Указанными границами следует оценивать значение вицинальной константы аминокислотного остатка, соответствующее предполагаемой пространственной структуре молекулы, т. е. полученное из эксперимента значение вицинальной константы $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$ следует сопоставлять с областью значений $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$, которые являются допустимыми для предлагаемой конформации остова аминокислотного остатка. Согласно изложенным выше соображениям, более точное вычисление

теоретически предсказываемой вицинальной константы и ее сопоставление с экспериментальным значением, по-видимому, лишено смысла.

3. Можно считать, что предлагаемая конформация пептида противоречит экспериментальным данным, если одно или несколько экспериментально установленных значений вицинальных констант лежат вне соответствующих теоретически допустимых областей.

4. Значения вицинальных констант в области 6,5—9,0 Гц удовлетворяют практически любой разумной конформации молекулы, и экспериментальные значения $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$ из этой области дают весьма малую информацию о ее пространственной структуре. Вообще существенные ограничения на возможную пространственную структуру пептидной молекулы накладываются лишь крайними значениями полученных из эксперимента вицинальных констант $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}) < 2,5$ и $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}) > 9,0$ (этот факт отмечается также в обзоре [230]).

К сожалению, почти все вицинальные константы для ангиотензина, найденные в [104, 106, 123, 159, 225], лежат в области 6,5—9,0 Гц; исключение составляет лишь значение константы для остатка His⁶ ($6,0 \pm 0,5$), полученное в [159, 225]: такое значение вицинальной константы более соответствует конформации R остова остатка His⁶, однако, поскольку в аминокислотной последовательности ангиотензина этот остаток предшествует пролину, эта конформация является стерически «запрещенной» [19, 111]. В этой связи следует отметить, что работы [104, 106] предлагают более высокое значение рассматриваемой константы — $7,0 \pm 0,3$ и $7,6$ Гц соответственно.

Таким образом, набор значений вицинальных констант $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$ для молекулы ангиотензина удовлетворяет любой структуре остова молекулы, образованной комбинацией стабильных конформаций остатков типов B, R и L.

Изложенными выше характеристиками пространственной структуры молекулы ангиотензина практически исчерпывается весь спектр структурной информации, который можно получить из описанных к настоящему времени результатов физико-химических исследований конформаций ангиотензина в растворе. Эти характеристики можно условно разделить на две группы: данные, касающиеся конформации остова молекулы, и результаты, относящиеся к конформации и сравнительной подвижности боковых цепей. Ниже на этой основе проводится сопостав-

ление данных эксперимента с расчетными структурами, полученными в предыдущем разделе, а также с описанными ранее (см. раздел 1.1) моделями пространственной структуры ангиотензина. Прежде всего суммируем данные, относящиеся к конформации остова молекулы.

1. В водном растворе молекула имеет компактную структуру со средним радиусом 8 \AA (диализ, ^{13}C -ЯМР-спектроскопия). Этому требованию удовлетворяют все расчетные структуры, а также все модели пространственной структуры молекулы, за исключением, возможно, состояния статистического клубка [233].

2. N- и C-концевые группы молекулы сближены (потенциометрическое титрование, ^{13}C -ЯМР-спектроскопия). Именно такое расположение N- и C-концевой группы наблюдается во всех структурах, предсказываемых расчетом, модели β -витка (но не γ -витка), структурах кросс- β -формы I и II и всех структурах, полученных в [117]. Другие модели пространственной структуры молекулы ангиотензина не обладают этой особенностью.

3. Наличие п осто́ве молекулы изгиба кросс- β -типа (КД-, ИК- и рамановская спектроскопия). Наряду со структурами кросс- β -форм I и II та же особенность отмечается во всех расчетных структурах, моделях γ - и β -витков, а также в ряде структур молекулы, описанных в [117] (во всяком случае наиболее стабильная из этих структур обладает указанным изгибом). В то же время модели α -спиральной структуры и состояние статистического клубка не предусматривают такой характеристики структуры остова.

4. Наличие в гексапептиде АТ 3—8 одного или двух «медленных» амидных протонов (кинетика изотопного обмена, ^1H -ЯМР-спектроскопия). Такое требование согласуется с моделями γ - и β -витков, α -спиральной структуры, а также со структурами, рассчитанными в [117]. Модель кросс- β -формы I предусматривает большее количество «медленных» протонов пептидном осто́ве; это, как упоминалось, может быть следствием влияния органического растворителя.

Почти все рассмотренные выше модели пространственной структуры ангиотензина объясняют наличие «медленных» амидных протонов их вовлечением во внутримолекулярные водородные связи. В то же время рассчитанные в разделе 1.2 наиболее стабильные конформации пептидного осто́ва молекулы ангиотензина, как правило, не содержат амидных протонов, участву-

ющих в образовании внутримолекулярных водородных связей. Исключение составляет лишь водородная связь группы NH остатка Val³ с группой CO остатка Pro⁷ в структурах типа BBLRRBRB. Однако все предложенные структуры содержат в остове атомы водорода, в той или иной степени экранированные от воздействия растворителя. Так, в наиболее стабильной конформации остова BRBRRBBB амидный водород остатка Phe⁸ полностью экранирован от растворителя. Частично экранирован в этой конформации также амидный водород остатка His⁶ (см. рис. 1.9). Вообще амидные протоны остатков Phe⁸ и His⁶ частично или полностью недоступны для растворителя во всех шести наиболее стабильных конформациях остова ангиотензина. В структурах типа BBLRRBBB (см. рис. 1.10), кроме того, частично экранирован от растворителя амидный водород остатка Val³. Таким образом, для предлагаемых стабильных конформаций молекулы ангиотензина следует ожидать наличие одного, двух или трех медленно обменивающихся атомов водорода.

Следует также отметить, что в ряде структур некоторые группы CO и NH оказываются пространственно сближенными. Так, например, конформация остова BRBRRBBB допускает сближение карбонильного кислорода остатка Tyr⁴ с амидным водородом остатка His⁶ на расстояние $\sim 3,5$ Å. Дальнейшее сближение этих атомов при принятой параметризации водородной связи является энергетически невыгодным. Однако такое сближение может произойти, если энергетический вклад водородной связи окажется более существенным, например в органическом растворителе типа трифторэтанола. Таким образом, значительное число структурных амидных водородов, полученное в [180], можно, в принципе, также объяснить в рамках предложенных структур.

5. Амидный протон остатка Arg² доступен влиянию растворителя (кинетика изотопного обмена). Это условие выполняется для всех расчетных структур, для структур, полученных в [117], для моделей γ - и β -витков и не выполняется для структуры кросс- β -формы II. К сожалению, оригинальные работы, содержащие описания кросс- β -формы I, α -спиральной структуры и конформации «статистического клубка», не приводят сведений об этой детали структуры молекулы.

6. Набор вицинальных констант $^3J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$ (^1H -ЯМР-спектроскопия). Выше уже отмечалось, что предлагаемые в ра-

ботах [104, 105] молекулы ангиотензина остова молекулы расчетное значение в структуре γ -витка далеко за пределами минимума В. Соответствует достаточно более остатка валина заметно ограничена, в [159, 2] экспериментально тант.

Перед тем как данных об ориентации результатами расчетов молекулы, следует модели описаны и боковых цепей: так вести для состояний для структур γ - и α -спиральной структуры.

1. Отсутствие дазольным кольцом (титрование). Указана модель, приведенная в [330].

2. Сравнитель боковой цепи остатка. Это свойство также структур моделей γ - и β -подвижность фермент ограниченной.

3. Подвижность (троскопия). Ограничена постулируемая относительная сдвиг боковой цепи, в которых

ботах [104, 106, 159, 225] наборы вицинальных констант для молекулы ангиотензина удовлетворяют весьма многим структурам остова молекулы. Тем не менее следует отметить, что расчетное значение вицинальной константы для остатка Val⁵ в структуре γ -витка составляет 2,5 Гц ($\phi \sim 175^\circ$), что выходит далеко за пределы допустимых значений для области локального минимума В. Учитывая, что значение угла $\phi \sim 175^\circ$ соответствует достаточно напряженному состоянию любого остатка, тем более остатка валина, конформационная подвижность которого заметно ограничена, можно утверждать (как отмечалось, в частности, в [159, 225]), что модель γ -витка не удовлетворяет экспериментально установленному набору вицинальных констант.

Перед тем как проводить сопоставление экспериментальных данных об ориентации и подвижности боковых цепей с результатами расчетов и моделями пространственной структуры молекулы, следует сделать замечание о том, что далеко не все модели описаны их авторами «с точностью» до конформаций боковых цепей: так, упомянутое сопоставление невозможно провести для состояния статистического клубка и довольно трудно для структур γ - и β -витков, кросс- β -форм I и II, а также для α -спиральной структуры.

1. Отсутствие ион-дипольного взаимодействия между имидазольным кольцом остатка His⁶ и С-концевым карбоксилем (титрование). Указанной особенностью структуры не обладает лишь модель, предложенная для трипептида His⁶-Pro⁷-Phe⁸ в [330].

2. Сравнительная подвижность и доступность растворителю боковой цепи остатка Tyr⁴ (титрование, ¹³C-ЯМР-спектроскопия). Это свойство характерно для всех расчетных структур, а также структур, полученных в [117], кросс- β -форм I и II и моделей γ - и β -витков. В случае же α -спиральной структуры подвижность фенольного кольца тирозина должна быть более ограниченной.

3. Подвижность боковой цепи остатка Phe⁸ (¹³C-ЯМР-спектроскопия). Ограничение подвижности боковой цепи фенилаланина постулируется лишь в одной из упомянутых моделей пространственной структуры молекулы — α -спиральной структуры. Относительная ограниченность конформационной свободы указанной боковой цепи характерна также для расчетных структур, в которых остаток Pro⁷ имеет конформацию В; в случае

Сопоставление различных моделей пространственной структуры молекулы ангиотензина с экспериментальными данными

Экспериментальная характеристика пространственной структуры	Расчетные структуры, удовлетворяющие указанным требованиям	Модели пространственной структуры ангиотензина						
		априорные структуры	γ -виток	β -виток	кросс- β -форма I	кросс- β -форма II	α -спираль	статистический клубок
Остов								
Компактная структура, $r \sim 8 \text{ \AA}$ (диффракция, ^{13}C -ЯМР)	Весь набор	+	+	+	+	+	+	—
Сближенность N- и C-концов (титрование, ^{13}C -ЯМР)	„ „	+	—	+	+	+	—	—
Изгиб кросс- β -типа (КД-, ИК-, рамановские спектры)	„ „	+	+	+	+	+	—	—
Наличие двух или трех «медленных» амидных протонов (кинетика изотопного обмена, ^1H -ЯМР)	„ „	+	+	+	+	—	+	—
Доступность растворителю амидного протона остатка Arg ² (кинетика изотопного обмена)	„ „	+	+	+	?	—	?	?
Транс-конформация пептидной связи His ⁶ -Pro ⁷ (^{13}C -ЯМР)	„ „	+	—	+	—	+	+	+
Набор констант $J(\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H})$ (^1H -ЯМР)	„ „	+	—	+	+	+	+	+

Боковые цепи

Подвижность боковой цепи остатка Tug ⁴ (титрование, ^{13}C -ЯМР)	Весь набор	+	+	+	+	+	—	?
Расстояние между боковыми цепями остатков в положениях 1 и 4 $\sim 8 \text{ \AA}$ (флюоресцентный анализ)	BRBRRBBB BBLRRBBB BBLRRBBB	—	—	—	—	+	—	—
Подвижность боковой цепи остатка Phe ⁸ (^{13}C -ЯМР)	BBLRRBRB BBBBRBRB	?	?	?	?	+	—	?
Доступность растворителю боковых цепей остатков Asp ¹ и Arg ² (кинетика изотопного обмена, ^{13}C -ЯМР)	Весь набор	+	+	+	+	+	+	?
Ограничение подвижности боковой цепи остатка Arg ² (титрование, ^{13}C -ЯМР)	" "	—	—	—	—	—	—	?

Таблица 1.13

Сопоставление различных моделей пространственной структуры
молекулы ангиотензина с экспериментальными данными

Экспериментальная характеристика пространственной структуры	Расчетные структуры, удовлетворяющие указанным требованиям	Модели пространственной структуры ангиотензина						
		априорные структуры	γ-виток	β-виток	кросс-β-форма I	кросс-β-форма II	α-спираль	статистический клубок
О с т о в								
Компактная структура, $r \sim \sim 8 \text{ \AA}$ (диализ, ^{13}C -ЯМР)	Весь набор	+	+	+	+	+	+	—
Сближенность N- и C-концов (титрование, ^{13}C -ЯМР)	„ „	+	—	+	+	+	—	—
Изгиб кросс-β-типа (КД-, ИК-, рамановские спектры)	„ „	+	+	+	+	+	—	—
Наличие двух или трех «медленных» амидных протонов (кинетика изотопного обмена, ^1H -ЯМР)	„ „	+	+	+	+	—	+	—
Доступность растворителю амидного протона остатка Arg ² (кинетика изотопного обмена)	„ „	+	+	+	?	—	?	?
Транс-конформация пептидной связи His ⁶ -Pro ⁷ (^{13}C -ЯМР)	„ „	+	—	+	—	+	+	+
Набор констант $J(\text{H}—\text{NC}^\alpha—\text{H})$ (^1H -ЯМР)	„ „	+	—	+	+	+	+	+

Боковые цепи

Подвижность боковой цепи остатка Tyr ⁴ (титрование, ¹³ C-ЯМР)	Весь набор	+	+	+	+	+	—	?
Расстояние между боковыми цепями остатков в положениях 1 и 4 ~ 8 Å (флуоресцентный анализ)	BRBRRBBB BBLRRBBB BBLRRBBB	—	—	—	—	+	—	—
Подвижность боковой цепи остатка Phe ⁸ (¹³ C-ЯМР)	BBLRRBRB BBBBRBRB	?	?	?	?	+	—	?
Доступность растворителю боковых цепей остатков Asn ¹ и Arg ² (кинетика изотопного обмена, ¹³ C-ЯМР)	Весь набор	+	+	+	+	+	+	?
Ограничение подвижности боковой цепи остатка Arg ² (титрование, ¹³ C-ЯМР)	„ „	—	—	—	—	—	—	?

же конформации R остатка Pro⁷ подвижность боковой цепи фенилаланина значительно увеличивается.

4. **Доступность растворителю боковых цепей остатков Asn¹ и Arg²** (кинетика изотопного обмена, ¹H-ЯМР-спектроскопия). Все структуры, полученные расчетом, удовлетворяют этому требованию; то же можно сказать и о всех упомянутых моделях пространственной структуры ангиотензина.

5. **Сближенность гуанидиновой группы остатка Arg² и C-концевого карбоксила и ограниченная лабильность боковой цепи остатка Arg²** (титрование, ¹³C-ЯМР-спектроскопия). Эта чрезвычайно характерная для всех расчетных структур особенность полностью отсутствует у всех предложенных ранее моделей пространственной структуры молекулы.

6. **Сближенность боковых цепей остатков в положениях 1 и 4 на расстояние менее 8 Å** (флюоресцентный анализ). Если предполагать, что для структур, предлагаемых расчетом, замена остатка Asn¹ остатком Trp¹ не скажется на конформации остова, то можно, пользуясь, например, молекулярными моделями Дрейдинга, оценить среднее расстояние между C^β-атомами остатков триптофана и тирозина в каждой из наиболее стабильных конформаций остова (см. табл. 1.12). Такое «усредненное» по ротамерам боковых цепей расстояние для структуры BRBRRBBB составило 7,0 Å, BBLRRBBB — 7,5, BBBRRBBB — 11,4, BBLRRBRB — 5,0, BBBBRBBB — 10,8 Å и для структуры BBBBRBRB — 10,6 Å. Таким образом, учитывая точность оценок, можно считать, что и эта пространственная характеристика совместима со структурами (в особенности с наиболее стабильными), предлагаемыми расчетом; в то же время ее наличие противоречит как предположению о существовании вытянутой формы молекулы, так и модели α-спирали или γ- и β-витков.

Сопоставление с экспериментальными данными можно более наглядно представить в виде табл. 1.13, где знаком «+» отмечен факт совпадения тех или иных элементов пространственной структуры молекулы, предлагаемых различными моделями, с экспериментальными данными, знаком «—» — отсутствие такого совпадения и знаком «?» — случаи, когда данный вопрос не исследован в соответствующих оригинальных работах. Видно, что всей совокупности экспериментальных данных удовлетворяет лишь набор структур, полученный расчетными средствами; многим экспериментальным характеристикам простран-

Конформации молекулы ангиотензина

ственной структуры молекулы удовлетворяют структуры, предложенные в [117], и модель β -витка. Более слабое соответствие с экспериментом наблюдается для модели кросс- β -форм I и II и γ -витка; гипотезы статистического клубка и α -спиральной структуры полностью расходятся с экспериментальными данными.

Следует особо отметить то обстоятельство, что весь набор расчетных структур, описанный выше, удовлетворяет совокупности имеющихся экспериментальных сведений о пространственной структуре молекулы в водном растворе (исключение составляет лишь требование подвижности боковой цепи остатка Phe⁸, но и в этом случае в наборе есть структуры, ему удовлетворяющие). Таким образом, представляется весьма вероятным, что этот набор конформаций действительно включает основные типы реальных стабильных структур молекулы ангиотензина в водном растворе.

Глава

2

РЕЦЕПТОРЫ АНГИОТЕНЗИНА

Систематический и достаточно детальный анализ путей и механизмов реализации физиологических эффектов, вызываемых ангиотензином, в настоящее время невозможен. Даже процессы, развивающиеся под действием ангиотензина на клетках-мишенях (впредь речь пойдет почти исключительно о гладкомышечных клетках), исследованы совершенно недостаточно; еще большие трудности встречаются на пути описания реакции тканей, органов или целого организма.

Это замечание справедливо не только в отношении ангиотензина, но и других вазоактивных агентов; между тем необходимость решения ряда задач (как относящихся к разряду фундаментальных исследований, так и прикладных) привела к появлению различного рода условных или эмпирических интерпретационных схем, подчас довольно сложных. Укажем хотя бы математическую модель динамики прессорного эффекта, предназначенную для использования в автоматической системе регулирования давления крови больного в ходе хирургической операции [24]. Правильно описывая реакцию организма в сложных ситуациях, она, тем не менее, является полностью эмпирической и непригодна для анализа механизмов, лежащих в основе этой реакции.

Центральную роль во всех попытках анализа механизмов действия ангиотензина играют представления оккупационной теории [18, 215]. Ее наиболее распространенный вариант, ставший в известном смысле стандартной основой трактовки кривых «доза—эффект» в фармакологии и токсикологии, базируется на следующих двух предположениях:

1. Связывание агониста рецепторными структурами описывается изотермой Лэнгмюра.

2. Реакция пропорциональна количеству связанного агониста.

Правда, исследования последних лет дали множество примеров биологически активных соединений, молекулярный механизм действия которых не соответствует одному из этих постулатов или обоим сразу; более того, даже в тех случаях, когда они хотя бы приближенно выполняются, это имеет место в сравнительно узком интервале «физиологических» концентраций агонистов. Тем не менее роль этих представлений в исследованиях по молекулярной фармакологии и токсикологии весьма значительна, ибо на их основе могут быть получены некие унифицированные характеристики, разделяющие сродство агониста к рецептору и амплитуду вызываемого им эффекта. Благодаря этому теория Кларка—Ариенса оказалась полезным инструментом классификации получаемых оценок биологической активности, хотя оба полученных параметра Π подавляющем большинстве случаев не имеют приписываемого им физического смысла Π должны рассматриваться как некие условные характеристики.

Поскольку большинство данных о различных проявлениях биологической активности ангиотензина и его аналогов интерпретировалось их авторами в терминах оккупационной теории, представляется целесообразным рассмотреть масштабы и характер неопределенностей, сопутствующих такого рода анализу. В этой главе рассматривается с этой точки зрения соответствующий круг экспериментальных результатов, относящихся к взаимодействию молекул ангиотензина с клетками-мишенями и изолированными органами.

2.1. СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ АНГИОТЕНЗИНА РЕЦЕПТОРАМИ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

Наиболее надежные сведения о взаимодействии молекулы ангиотензина с клетками-мишенями получены в экспериментах с применением меченого ангиотензина. Соответствующая библиография в настоящее время довольно обширна; мы остановимся более подробно на результатах, относящихся к гладким мышечным клеткам [74, 75, 81, 96, 127—129, 132, 166, 181, 200, 204, 295, 328]. Важнейшие выводы, полученные авторами другой группы работ, выполнявшихся на клетках клубочковой зоны

коры надпочечников [70, 73, 90, 103, 121, 134, 147, 161, 162, 166, 204, 245, 247], хорошо согласуются с ними.

Вопрос о локализации рецепторов ангиотензина был разрешен главным образом усилиями группы французских исследователей [74, 75, 81, 96, 127, 129, 132, 181, 295, 328], установивших, что микросомальная фракция, отличающаяся наиболее высоким уровнем общего и специфического связывания ^3H -ангиотензина, является фракцией плазматических мембран. Этот вывод сделан на основании определения активности ферментов — 5-нуклеотидазы, Mg-АТФ-азы, аденилатциклазы, связанных, согласно существующим представлениям, именно с плазматическими мембранами. С другой стороны, во фракции, наиболее активно связывающей меченый ангиотензин, отсутствует активность ферментов-маркеров внутриклеточных структур, что также свидетельствует в пользу сделанного заключения. Эти результаты были получены на клетках гладких мышц аорты кролика и матки крысы и подтверждены исследованиями, проведенными на гладких мышцах аорты морской свинки [200], клетках клубочковой зоны коры надпочечников [90, 147, 161, 162, 166] и тканях мозга [83, 133].

Показателем специфичности связывания радиоактивного ангиотензина (в различных опытах использовался ^3H -, ^{125}I -, ^{14}C -ангиотензин) явилось ингибирование связывания избытком не-радиоактивного ангиотензина или сильного конкурентного антагониста ангиотензина; именно степень уменьшения общей радиоактивности мембранных препаратов под действием избытка немеченого ангиотензина и должна, строго говоря, рассматриваться как мера уровня ангиотензина, специфически связанного с рецепторами мембран.

Примеры, иллюстрирующие этот факт применительно к фракциям плазматических мембран двух типов клеток-мишеней ангиотензина, приведены на рис. 2.1. В том, что это связывание осуществляется за счет рецепторов, специфичных лишь в отношении ангиотензина, а не универсальных центров, общих для более широкого класса биорегуляторов со сходным спектром действия, убеждает отсутствие явлений ингибирования связывания радиоактивного ангиотензина такими соединениями, как норадреналин [74, 75, 81, 181], вазопрессин [74, 181, 204], простагландины [75], брадикинин [200, 204], окситоцин, АКТГ, ацетилхолин, серотонин и инсулин [204]. Далее было установлено, что эффективное связывание ангиотензина плазматичес-

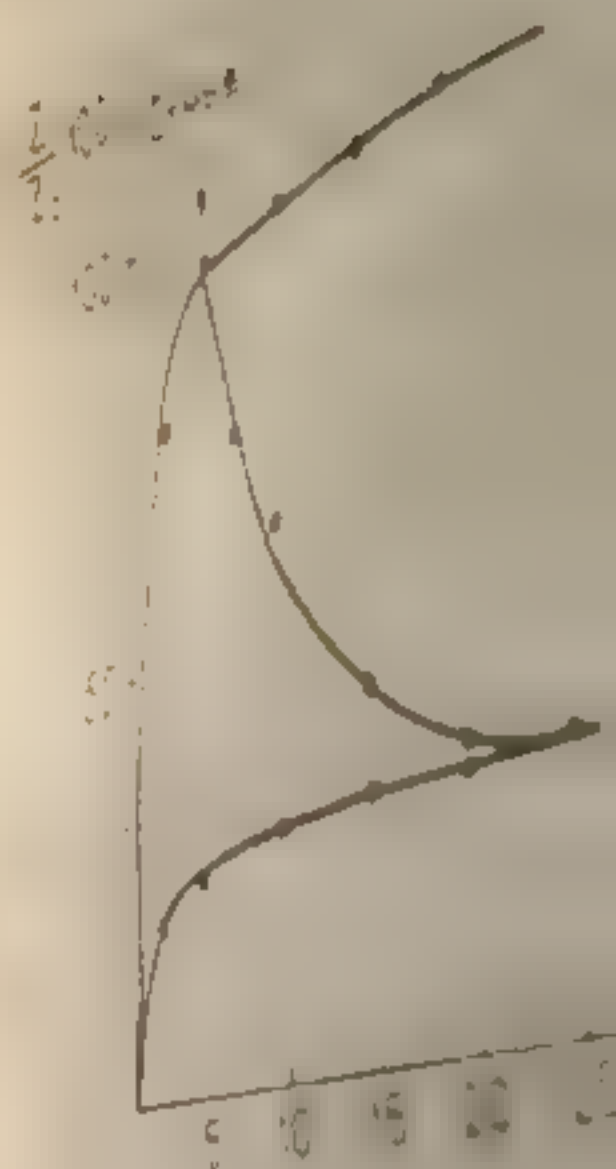


Рис. 2.1. Специфическое связывание ангиотензина с плазматическими мембранами клеток клубочковой зоны коры надпочечников.

кими мембранами клеток клубочковой зоны коры надпочечников (табл. 2.1). Стационарные и кинетические процессы связывания ангиотензина с мембранами микросом, в первом приближении, достаточно хорошо описываются уравнением:

Общее и специфическое связывание с микросомой

Аорта
Печень
Клетки
Полуперmeable
связывание

Рецепторы ангиотензина

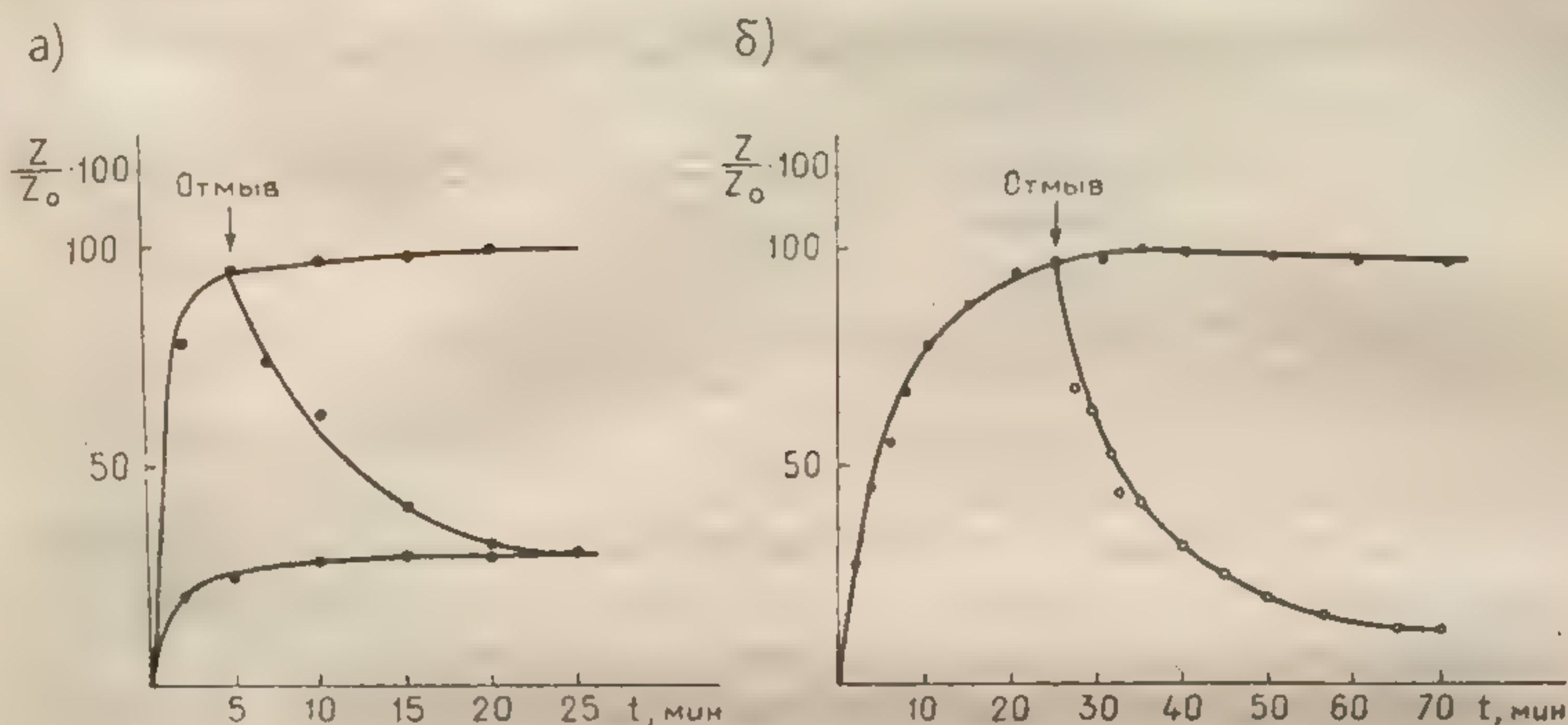


Рис. 2.1. Специфическое связывание меченого ангиотензина фракциями плазматических мембран клеток гладких мышц матки крысы [75] (а) и клубочковой зоны коры надпочечников быка [161] (б).

кими мембранами клеток-мишеней не характерно для мембран иных клеток (табл. 2.1).

Стационарные и кинетические зависимости, характеризующие процесс связывания ангиотензина мембранной фракцией микросом, в первом приближении (избыток меченого ангиотензина) достаточно хорошо описываются очевидными соотношениями:

$$z = \frac{QC}{K + C} \quad (2.1.1)$$

Таблица 2.1

Общее и специфическое связывание ^{14}C -ангиотензина с микросомальными фракциями различных тканей морской свинки [200]

Ткань	Связывание ^{14}C -ангиотензина, пмоль/мг белка	
	общее	специфическое
Аорта	$1,74 \pm 0,25$	$0,61 \pm 0,12$
Печень	$0,24 \pm 0,16$	$0,05 \pm 0,02$
Кожа	$0,65 \pm 0,14$	$0,10 \pm 0,04$
Поперечнополосатые мышцы	$0,32 \pm 0,22$	$0,15 \pm 0,05$

для концентрационной зависимости в равновесии,

$$z = \frac{k_1 Q C}{k'_1 + k_1 C} \{1 - \exp[-(k'_1 + k_1 C)t]\} \quad (2.1.2)$$

для кинетики связывания,

$$z = z_0 e^{-k'_1 t} \quad (2.1.3)$$

для кинетики отмывания.

Здесь z — количество образующихся гормон-рецепторных комплексов, Q — поверхностная концентрация рецепторов, C — концентрация ангиотензина в инкубационной среде, k_1 и k'_1 — прямая и обратная константы скорости образования комплекса «ангиотензин—рецептор», $K = \frac{k'_1}{k_1}$ — константа равновесия, а z_0 равно величине z к моменту начала отмывания.

Вообще говоря, следует считаться и с тем обстоятельством, что молекулы ангиотензина, связанные с рецепторами, могут подвергаться ферментативной деградации, причем образующиеся молекулярные фрагменты уже теряют сродство к рецептору [193]. Тем самым процесс распада гормон-рецепторных комплексов определяется еще и этим фактором, и константа k'_1 , входящая в соотношение (2.1.2), является не истинной константой скорости обратной реакции в схеме



а некоторой эффективной величиной:

$$\tilde{k}'_1 = k'_1 + k_2 E, \quad (2.1.5)$$

где E — концентрация пептидаз, расщепляющих молекулу ангиотензина в составе гормон-рецепторного комплекса, а k_2 — соответствующая константа скорости. Отметим, что поскольку один из важнейших ферментов, осуществляющих расщепление ангиотензина, — ангиотенгиназа является аминопептидазой, аналоги ангиотензина с определенными модификациями N-концевой части молекулы (прежде всего содержащие в первом положении остаток саркозина) характеризуются примерно вдвое большей эффективной константой равновесия комплекса «гор-

мон-рецепт
виде

иными слов
вый порядо
относящихся

Уравнени
чай, когда к
общим содер
ные кривые,
чарда, позво
зывания (ри

Два друг
наблюдаемы
циации урав
оценки знач
ции гормон
авторами.

а)

В/Ф

0.008

0.006

0.004

0.002

Рис. 2.2. С
а — клетк
зоны коры

Рецепторы ангиотензина

мон—рецептор» [260, 273], которая может быть записана в виде

$$K = \frac{k_1}{k'_1 + k_2 E}, \quad (2.1.6)$$

иными словами, величины k'_1 и $k_2 E$ имеют примерно одинаковый порядок, что должно учитываться при анализе данных, относящихся к аналогам с подобными модификациями.

Уравнения (2.1.1) — (2.1.3) легко обобщаются и на тот случай, когда количество связанного ангиотензина сравнимо с его общим содержанием в инкубационной среде [110]. Стационарные кривые, построенные для этого случая в координатах Скэтчарда, позволяют четко выделить участки специфического связывания (рис. 2.2).

Два других рисунка — 2.3 и 2.4 — иллюстрируют соответствие наблюдаемых на опыте кривых кинетики ассоциации и диссоциации уравнениям (2.1.2) и (2.1.3). В табл. 2.2 приведены оценки значений кинетических констант и констант диссоциации гормон-рецепторного комплекса, полученные различными авторами.

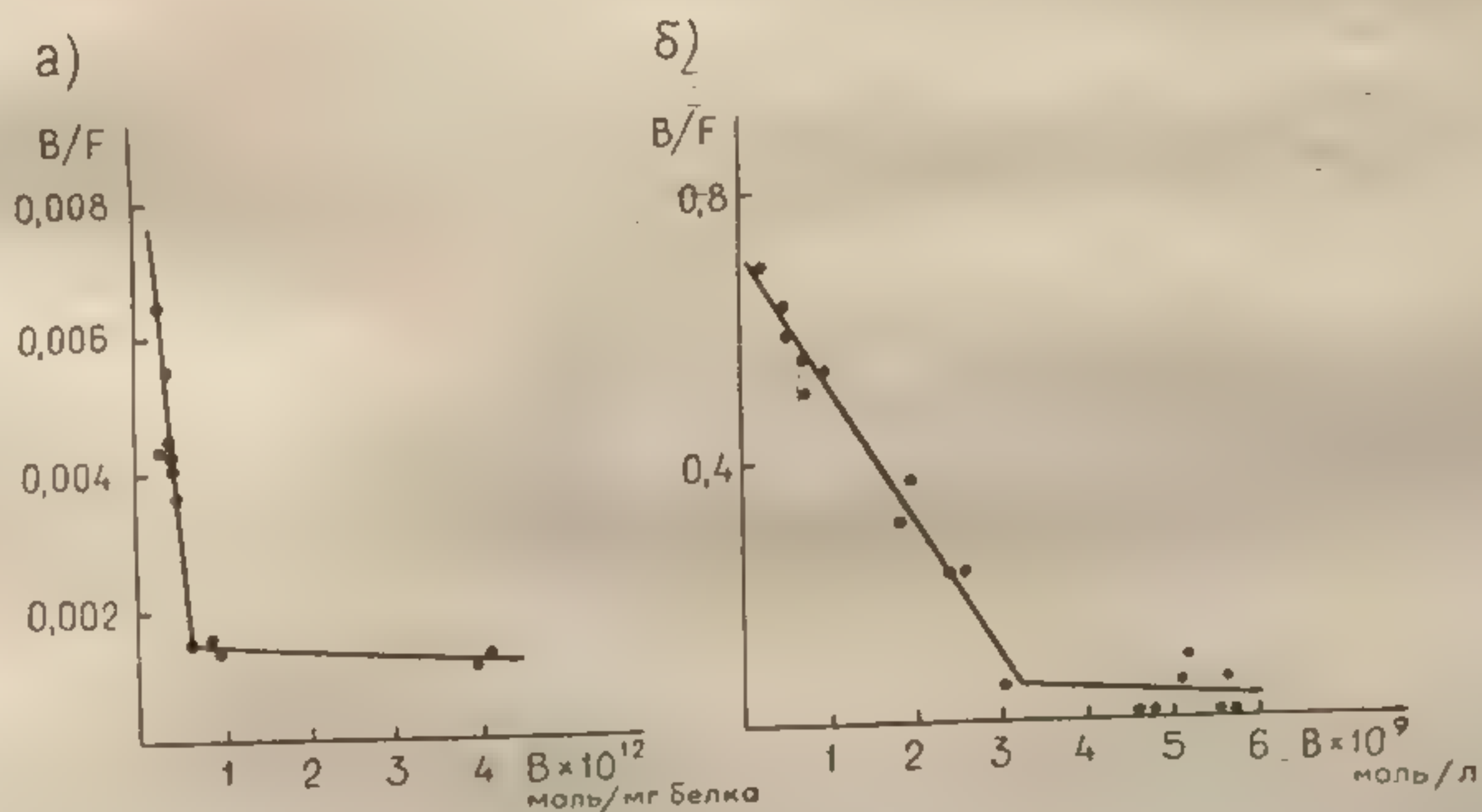


Рис. 2.2. Стационарные зависимости специфического связывания меченого ангиотензина, представленные в координатах Скэтчарда: а — клетки гладких мышц матки крысы [75]; б — клетки клубочковой зоны коры надпочечников быка [161]. В и F — концентрации связанного и свободного гормона, соответственно.

Кинетические константы k_1 и k'_1 являются в известном смысле мерой доступности рецепторов, так что колебания этих величин в зависимости от типа ткани и условий эксперимента не вызывают удивления. С другой стороны, большие расхождения в значениях констант равновесия могли бы указывать на различия в структуре соответствующих рецепторов. Отметим,

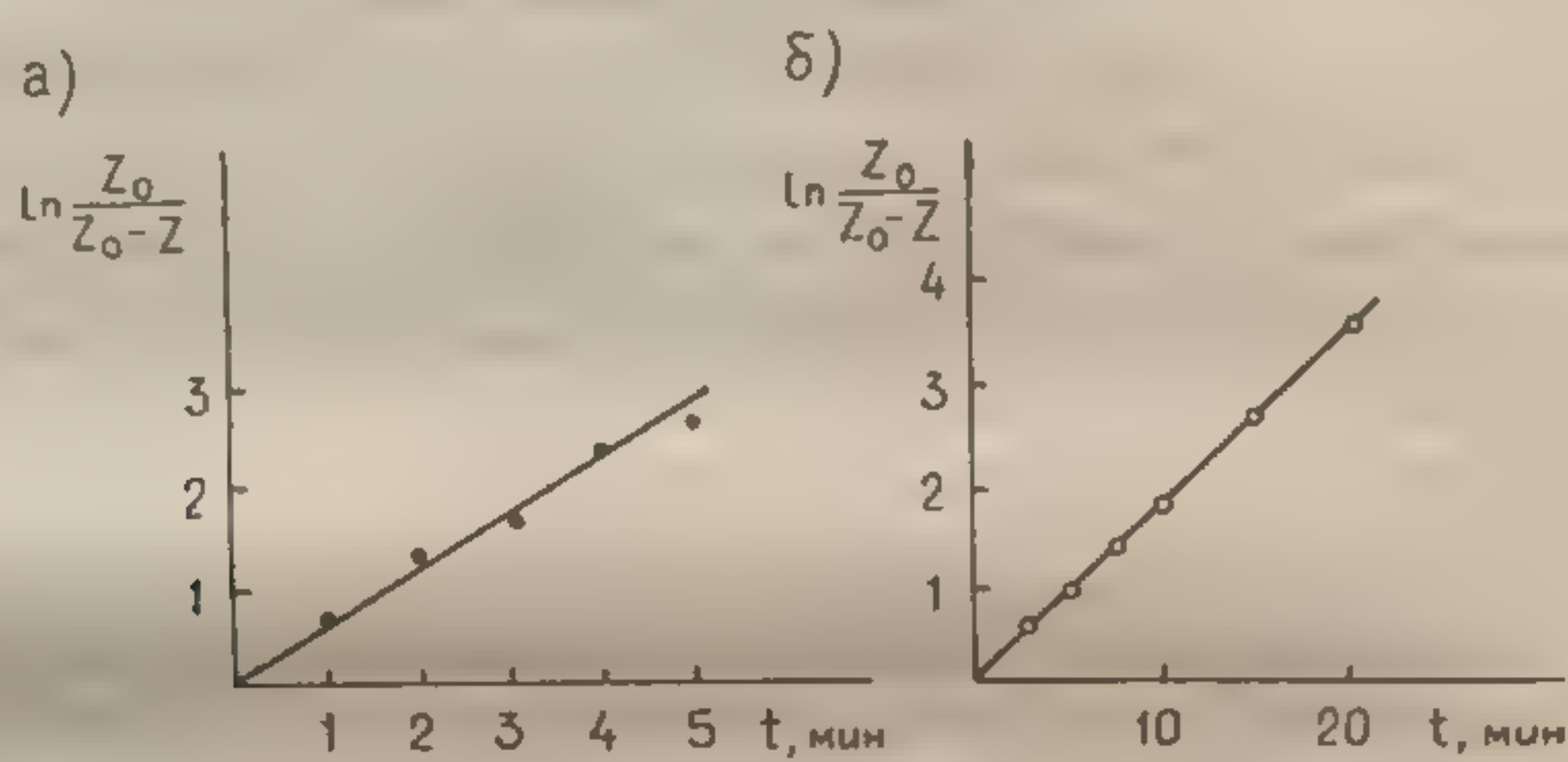


Рис. 2.3. Сопоставление кинетических кривых специфического связывания меченого ангиотензина фракцией плазматических мембран с зависимостями типа (2.1.2).

а — клетки гладких мышц матки крысы [75]; б — клетки надпочечников крысы (по данным [245]).

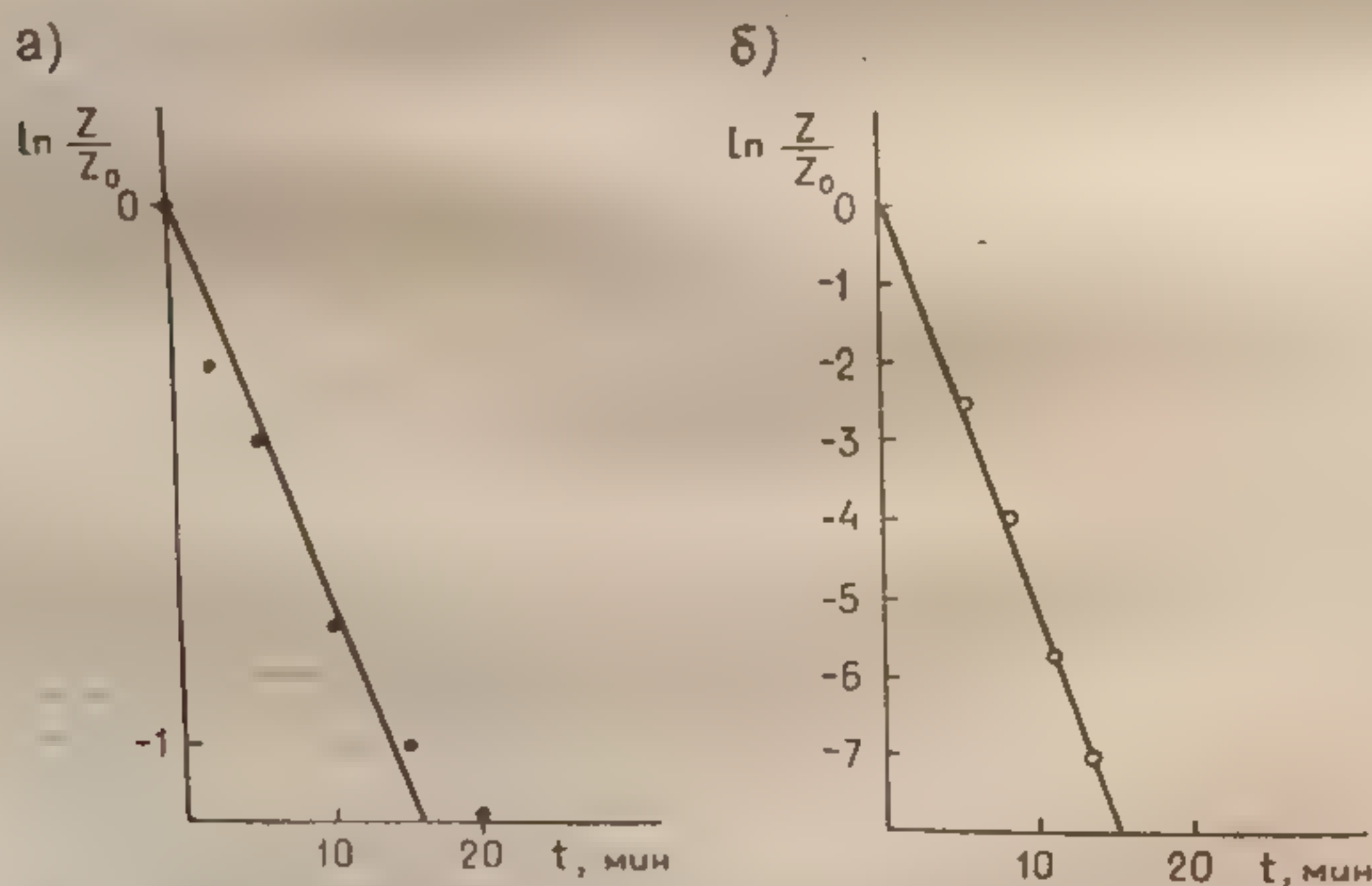


Рис. 2.4. Сопоставление кинетических кривых диссоциации специфически связанного меченого ангиотензина с зависимостями типа (2.1.3).

а — клетки гладких мышц матки крысы [75]; б — клетки клубочковой зоны коры надпочечников быка [204].

Ткань	Вид	Препарат	10^3 свободн. Z_0	$k_1 \cdot 10^3$	$k'_1 \cdot 10^3$	K_d
Матка крысы						
Надпочечники крысы						
Клубочковая зона коры надпочечников быка						

Таблица 2.2

Характеристики связывания меченого ангиотензина
препаратами тканей-мишеней

Ткань	Вид	Препарат	$10^5 \frac{k_1}{\text{моль/л}^{-1} \times \text{с}^{-1}}$	$k'_1, 10^{-4} \text{с}^{-1}$	$k_d^*, 10^{-9} \text{моль/л}$	Литературный источник
Аорта	Кролик	Полоска	—	—	13	[81]
		Фракция плазматических мембран	1,3	8	6	[128]
		Солюбилизированный препарат	2,5	40	16—20	[295]
	Морская свинка	Фракция плазматических мембран	—	—	22	[200]
Матка	Крыса	Фракция плазматических мембран	1,6	13	8—20	[75, 328]
Надпочечники	Бык	Микросомы коры надпочечников	2,4	5	2	[161]
		Фракция плазматических мембран	—	—	4	[147]
	Крыса	Изолированная клубочковая зона	6,6	22	3—5	[245]
	Кролик	Клетки клубочковой зоны	2,4	69	29	[70]
	Собака	Изолированная клубочковая зона	3,7	8	2,2	[257]

* В тех случаях, когда авторы оригинальных работ предполагают наличие связывающих центров двух типов, приведенное в таблице значение константы диссоциации соответствует связывающим центрам с максимальным сродством к ангиотензину.

что все значения констант K , приведенные в табл. 2.2, находятся практически в пределах одного порядка и различия между ними вряд ли можно считать достоверными, особенно с учетом того обстоятельства, что многие из этих оценок получены с помощью примитивных графических приемов.

Вопрос о гетерогенности рецепторов ангиотензина обсуждался в ряде работ, однако не получил однозначного решения [56, 85, 88, 89, 97, 212, 213, 234, 239, 265].

Вообще точность рассматриваемого круга экспериментов недостаточна для вполне уверенного суждения о соответствии процесса связывания ангиотензина рецепторами уравнениям (2.1.1)—(2.1.3), хотя это утверждение, как отмечалось, представляется вполне правдоподобным. Надежная дискриминация альтернативных гипотез в настоящее время, по-видимому, невозможна. В частности, не может быть выяснен важный вопрос о стехиометрии гормон-рецепторного комплекса. Разумеется, если присоединение каждой последующей молекулы ангиотензина к рецептору представляет собой независимый акт, оценка стехиометрического отношения на основании подобного рода экспериментов невозможна в принципе, однако в тех случаях, когда имеют место некоторые кооперативные эффекты, уравнения (2.1.1)—(2.1.3) претерпевают изменения. Например, если каждым рецептором связываются две молекулы гормона с разными константами равновесия комплексов K_1 и K_2 и константами скоростей k_1, k'_1, k_2, k'_2 , вместо уравнений (2.1.1)—(2.1.3) получаем соответственно

$$z = \frac{2QC(K_2 + C)}{(K_2 + C)^2 + K_2(K_1 - K_2)},$$

$$z = A - Be^{-\beta_1 t} - De^{-\beta_2 t}, \quad (2.1.7)$$

$$z = z_0 e^{-k'_1 t} + 2z'_0 \frac{2k'_1 + k'_2}{k'_1 - 2k'_2} (e^{-2k'_2 t} - e^{-k'_1 t}),$$

где z_0 — начальное количество связанных молекул гормона, z'_0 — начальное количество комплексов рецептор—две молекулы гормона, а A, B, D, β_1 и β_2 — параметры, сложным образом зависящие от $C, Q, k_1, k'_1, k_2, k'_2$.

К сожалению, и в этом случае точность приводимых в литературе измерений не позволяет сделать выбор между кривыми

типа (2.1.1)—(2.1.3)
умеренном разведении
молей оказываются
Попытки не удалось
(аналогично тому, что
и гамма-аминомасляной
времени предприняты
торы ангиотензина
близируются, сохраняя
ванию гормона. На
зата различными факторами
что рецептор ангиотензина
Данные о температурной зависимости

а)

1.0

0.5

б)

1.0

0.5

Рис. 2.5. Аппроксимация
штриховая линия
влияния

Рецепторы ангиотензина

типа (2.1.1)—(2.1.3) и (2.1.7). Как показывает рис. 2.5, при умеренном различии констант K_1 и K_2 характер обеих зависимостей оказывается очень близким.

Попытки непосредственного выделения рецепторных структур (аналогично тому, как были выделены рецепторы ацетилхолина и гамма-аминомасляной кислоты [118—120]) до настоящего времени предприняты не были; показано, однако, что рецепторы ангиотензина клеток гладких мышц аорты кролика солибилизируются, сохраняя способность к специфическому связыванию гормона. На основании результатов обработки солиблизата различными ферментами было высказано предположение, что рецептор ангиотензина является гликопротеидом [128]. Данные о температурной зависимости специфического связыва-

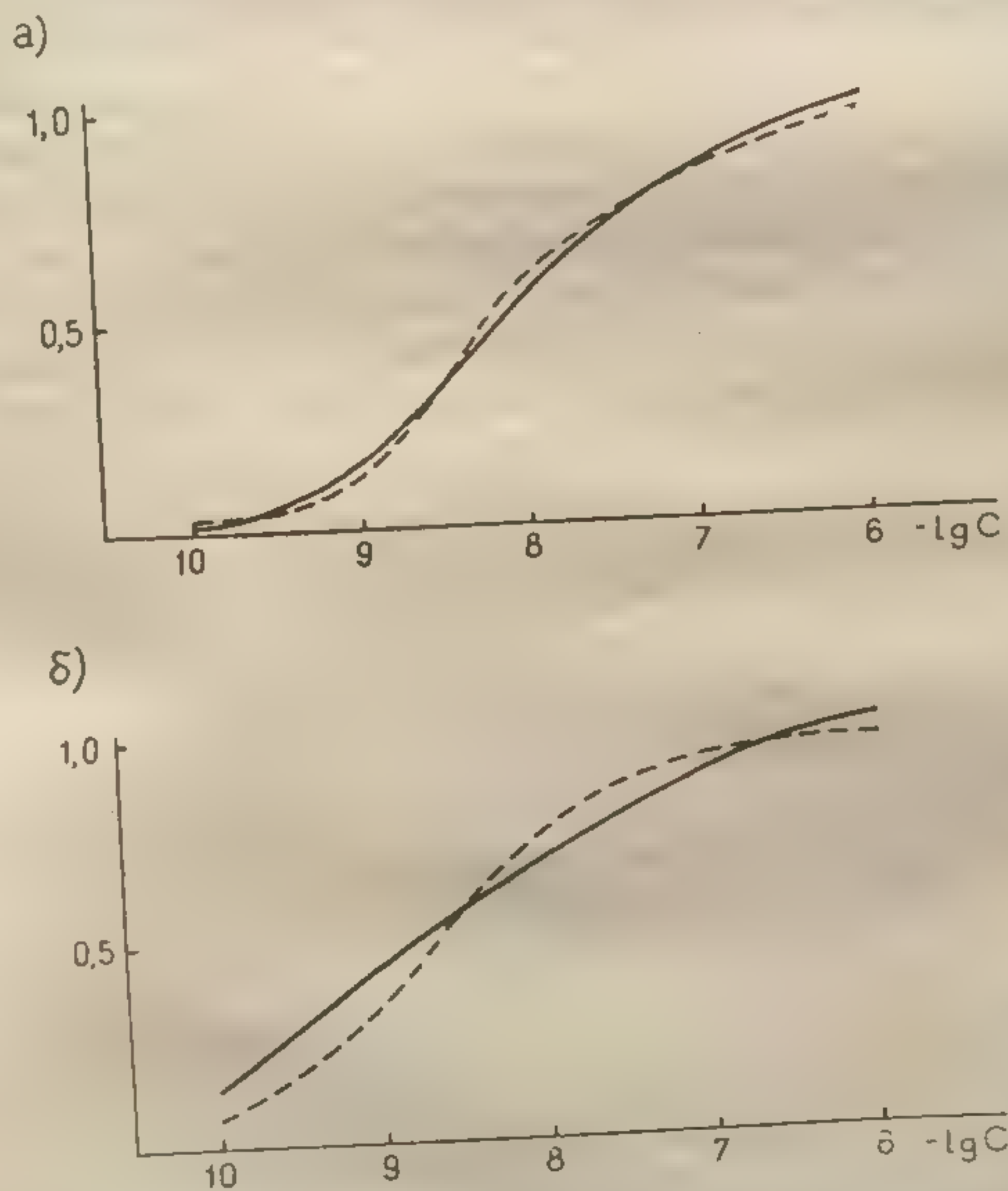


Рис. 2.5. Аппроксимация зависимости типа (2.1.7) уравнением (2.1.1) — штриховая линия — при различных значениях разности энергий ΔF_{12} связывания рецептором первой и второй молекулы эффектора.
а — $\Delta F_{12}=0,5$ ккал/моль; б — $\Delta F_{12}=2,0$ ккал/моль.

ния ангиотензина также дают основание полагать, что речь идет, по-видимому, о соединениях белковой природы, причем сродство к ангиотензину существенным образом зависит от сохранения нативной конформации. Так, уровень специфического связывания ангиотензина срезами матки крысы резко падает при нагревании свыше 50°C ; аналогичный эффект наблюдается и на клетках клубочковой зоны коры надпочечников (рис. 2.6).

Белковая природа рецепторов является препятствием на пути исследования характера сил, формирующих гормон-рецепторный комплекс, с помощью экспериментов, в которых используются воздействия, дестабилизирующие различные типы межмолекулярных связей. Дело в том, что большая часть воздействий подобного рода вызывает также и денатурацию белков, и поэтому однозначная интерпретация, например, зависимости специфического связывания от pH среды оказывается невозможной. Показано, что фракции плазматических мембран микросом клеток мышц аорты кролика [127] и морской свинки [200] обладают высоким специфическим сродством к ангиотензину лишь в узком интервале pH; можно по аналогии с иного типа реакциями клеточных мембран (см., например, [54]) с большой долей уверенности утверждать, что именно в силу

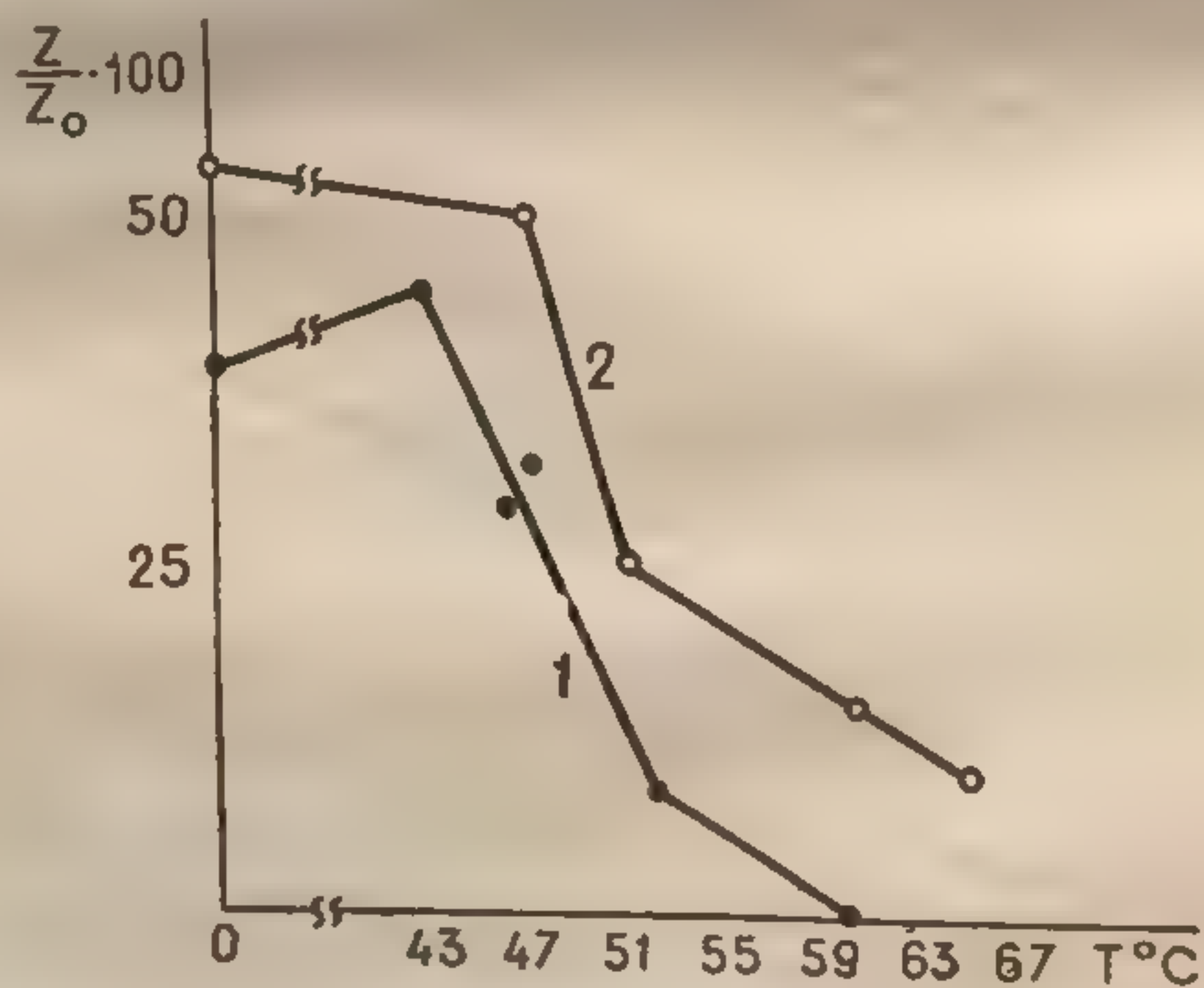


Рис. 2.6. Температурная зависимость специфического связывания меченого ангиотензина:
1 — срезами матки крысы, 2 — фракцией плазматических мембран клеток клубочковой зоны коры надпочечников быка [204].

немоного характера этой зависимости, обладающей резким максимумом, приходящимся на область физиологических значений рН, речь, скорее, должна идти о денатурационных эффектах, чем о прямом влиянии изменений рН на некие взаимодействия между молекулой гормона и рецептором. Следует заметить, что в значительной мере соображения подобного рода сохраняют силу также применительно к результатам экспериментов по изучению влияния на специфическое связывание ангиотензина рецепторами различных ионов и нуклеотидов [139, 160, 162, 222, 332].

В заключение отметим, что рассмотренные эксперименты, по существу, доказывают лишь наличие специфических центров связывания, локализованных в плазматических мембранах клеток-мишеней, причем специфическое связывание меченого ангиотензина подчиняется в первом приближении обычным кинетическим закономерностям (2.1.2), (2.1.3), а его концентрационная зависимость описывается изотермой Лэнгмюра. Естественное предположение, что указанные центры связывания являются также центрами, инициирующими биологическую реакцию на ангиотензин, нуждается все же в прямых доказательствах. Сходство кинетических и равновесных характеристик специфического связывания ангиотензина и биологической реакции наблюдается не всегда (см., например, [204]) и в силу ограничений, сформулированных в следующем разделе, может оказаться случайным. Корреляция между способностью фрагментов или аналогов ангиотензина ингибировать связывание меченого гормона и их биологическим действием также не является полной: фрагменты АТ 3—8, АТ 4—8 и АТ 5—8, обладающие, по данным биологического тестирования, низким относительным родством, обнаружили, тем не менее, высокую ингибирующую способность [74, 127]. В то же время косвенным подтверждением гипотезы о специфическом связывании меченого ангиотензина с центрами инициирования биологической реакции является исключение наиболее вероятного альтернативного предположения об образовании комплексов гормона с ферментами, осуществляющими его расщепление: по данным работ [166, 204], корреляция между специфическим связыванием 125 I-ангиотензина различными тканями и активностью в них ангиотенгиназ отсутствует. Более того, ЭДТА — агент, ингибирующий ангиотенгиназы, не подавлял, как сообщалось, специфическое связывание радиоактивного ангиотензина [204].

2.2. ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЦЕПТОРОВ АНГИОТЕНЗИНА С ПОМОЩЬЮ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ

Исследование закономерностей развития специфической реакции тканей или органов на ангиотензин может служить другим, хотя и гораздо более косвенным, источником информации о рецепторах ангиотензина. Очевидно, в силу сложности механизмов, лежащих в основе такой реакции, возможности получения надежных количественных суждений в этом случае сильно ограничены. Модельные представления и уравнения оккупационной теории должны использоваться с большой осторожностью и пониманием сопутствующих ограничений. Как явствует из результатов, обсуждавшихся в предыдущем разделе, первый постулат оккупационной теории, вероятнее всего, выполняется, по крайней мере в опытах с микросомными фракциями плазматических мембран.

Последняя оговорка существенна в том отношении, что в таких экспериментах, в отличие от опытов на изолированных органах, процесс связывания ангиотензина рецепторами в малой степени зависит от процесса диффузии гормона к рецепторам через толщу инертных структур. В простейшем представлении эффекты подобного рода могут быть учтены в рамках балансной модели, введенной Фурхготтом [154]. Схематически она представлена на рис. 2.7: предполагается, что количество комплексов «гормон—рецептор» определяется условиями равновесия в некоторой «биофазе», но не непосредственно в системе «рецептор—наружный раствор». Важно отметить, что система рассматривается как открытая: предполагается расход действующего агента с константой k_3 (метаболизация гормона, транспорт внутрь клетки и т. д.). В результате фактор диффузии может оказывать влияние не только на форму кинетических кривых, но и на стационарные оценки. Процесс образования гормон-рецепторного комплекса можно описать в этом случае уравнениями

$$\begin{aligned}\frac{db}{dt} &= k_1 C (B - b) - k'_1 b - k_2 b (Q - z) + k'_2 z - k_3 b, \\ \frac{dz}{dt} &= k_2 b (Q - z) - k'_2 z.\end{aligned}\quad (2.2.1)$$

Здесь B — максимальная «емкость» биофазы в отношении агониста; смысл констант k_i и других обозначений ясен из рис. 2.7.

Стационарный уровень количества гормон-рецепторных комплексов

$$z = \frac{QCB}{C(B + K_2) + K_2(K_1 + k_3/k_1)}, \quad (2.2.2)$$

таким образом, изменится по сравнению с (2.1.1) за счет уменьшения амплитуды и изменения эффективной константы равновесия.

В гораздо большей степени должен измениться характер кинетических зависимостей. На рис. 2.8, а приведены кривые $z(t)$, рассчитанные в предположении $b \gg z$; решение системы уравнений (2.2.1) в этом случае имеет вид

$$z = \frac{k_2 Q}{\beta} \Theta(t) \exp(-Dt - Fe^{-\beta t}),$$

где

$$\Theta(t) = \int_0^1 (1-y) y^{-\frac{D}{\beta} - 1} e^{Fy} dy; \quad (2.2.3)$$

$$\beta = k_1 C + k'_1 + k_3; \quad F = \frac{k_1 C B}{\beta^2};$$

$$D = \frac{k_1 k_2 C B}{\beta} + k'_2.$$

С уменьшением константы k_1 наблюдаются снижение наклона восходящего плеча кривой $z(t)$ и появление лаг-фазы (рис. 2.8, а). При $k_2 \gg k_1$, $k'_2 \gg k'_1$ (что, по-видимому, имеет место в действительности) эта тенденция должна проявляться все более четко по мере снижения температуры. Именно такая зависимость наблюдалась Бодуэн и соавт. [81] на ткани аорты кролика (рис. 2.8, б); к сожалению, в этих экспериментах измерялось не специфическое, а общее связывание ангиотензина.

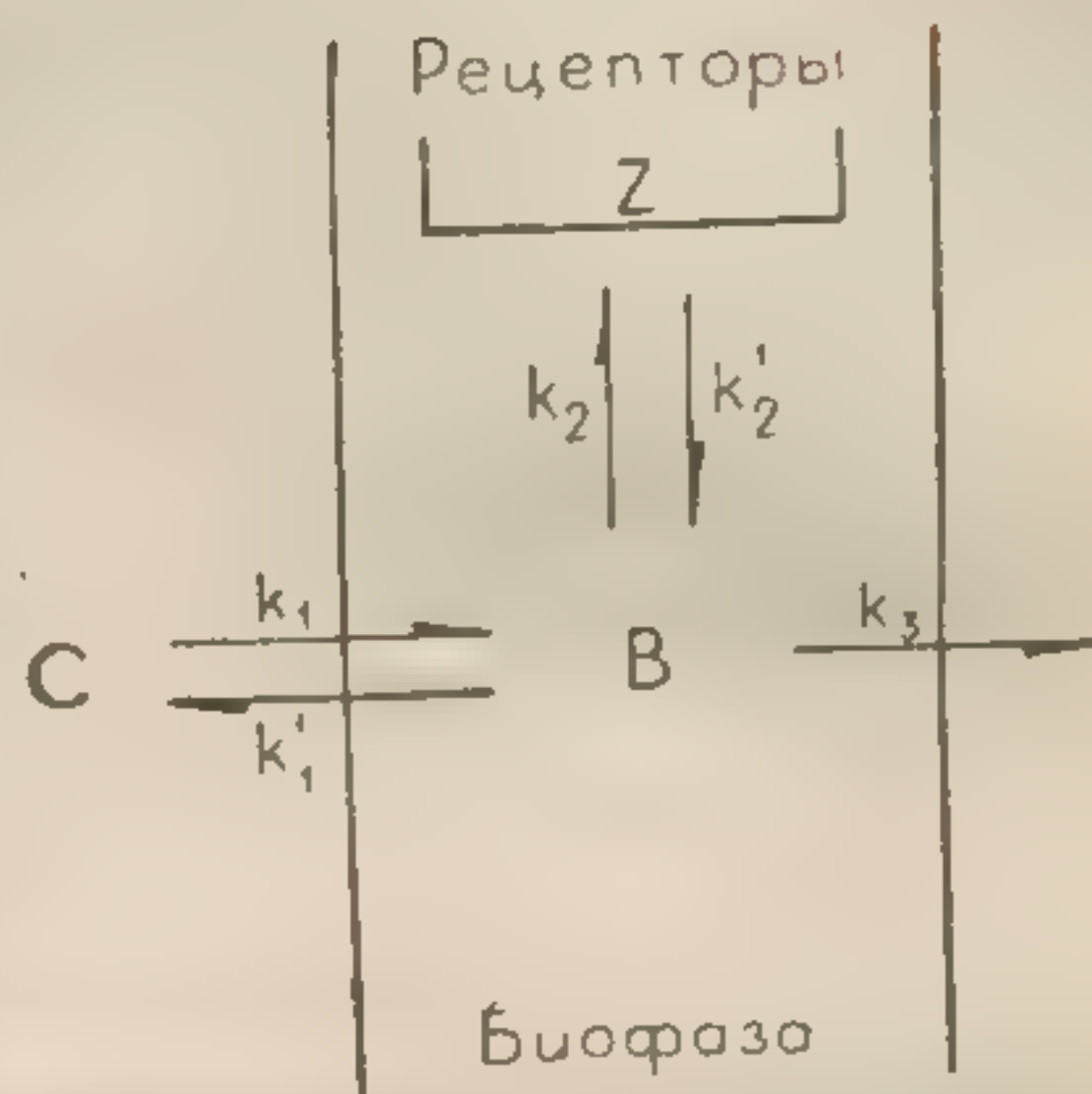


Рис. 2.7. Модель, предполагающая связывание агониста в «биофазе».

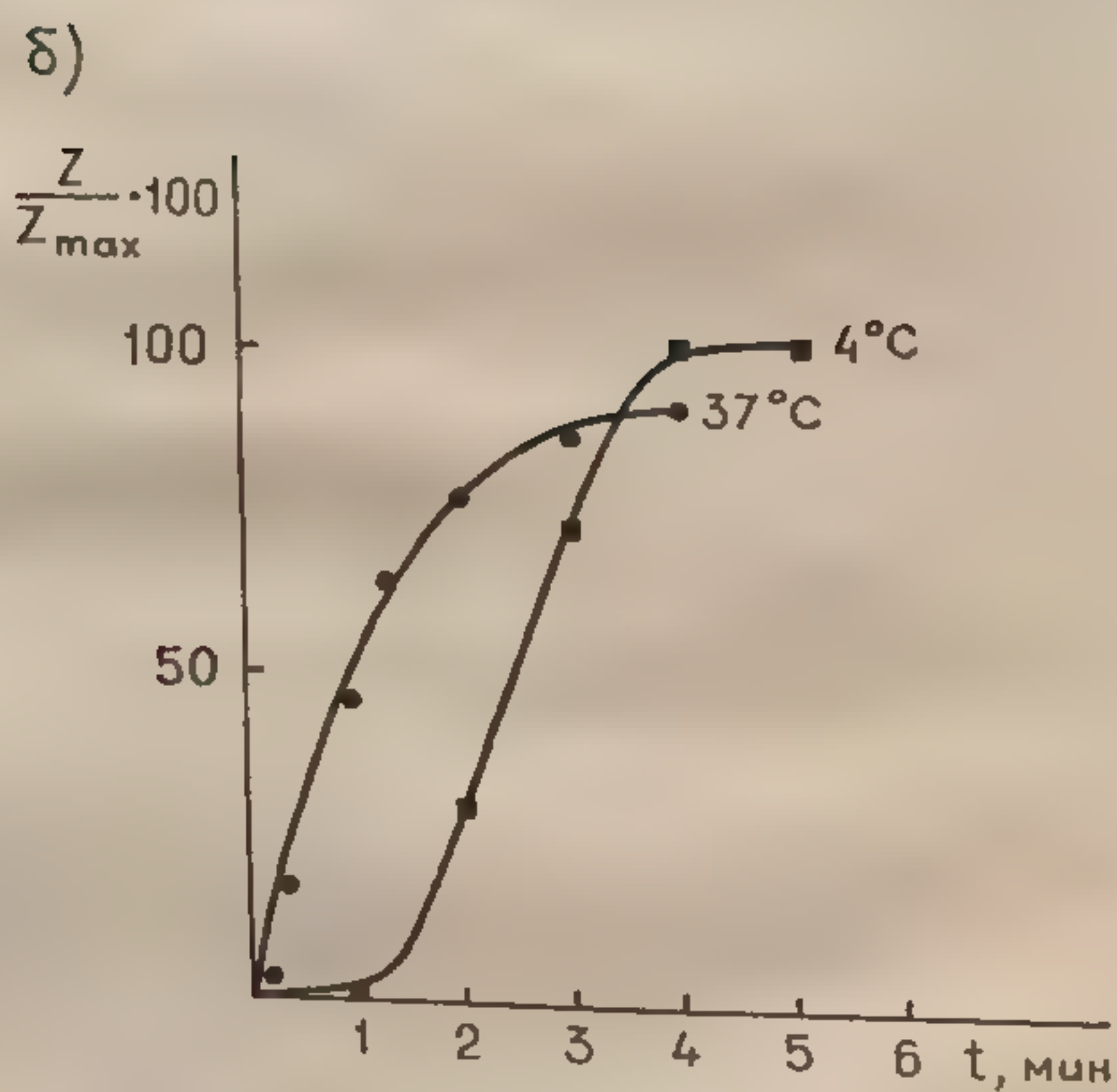
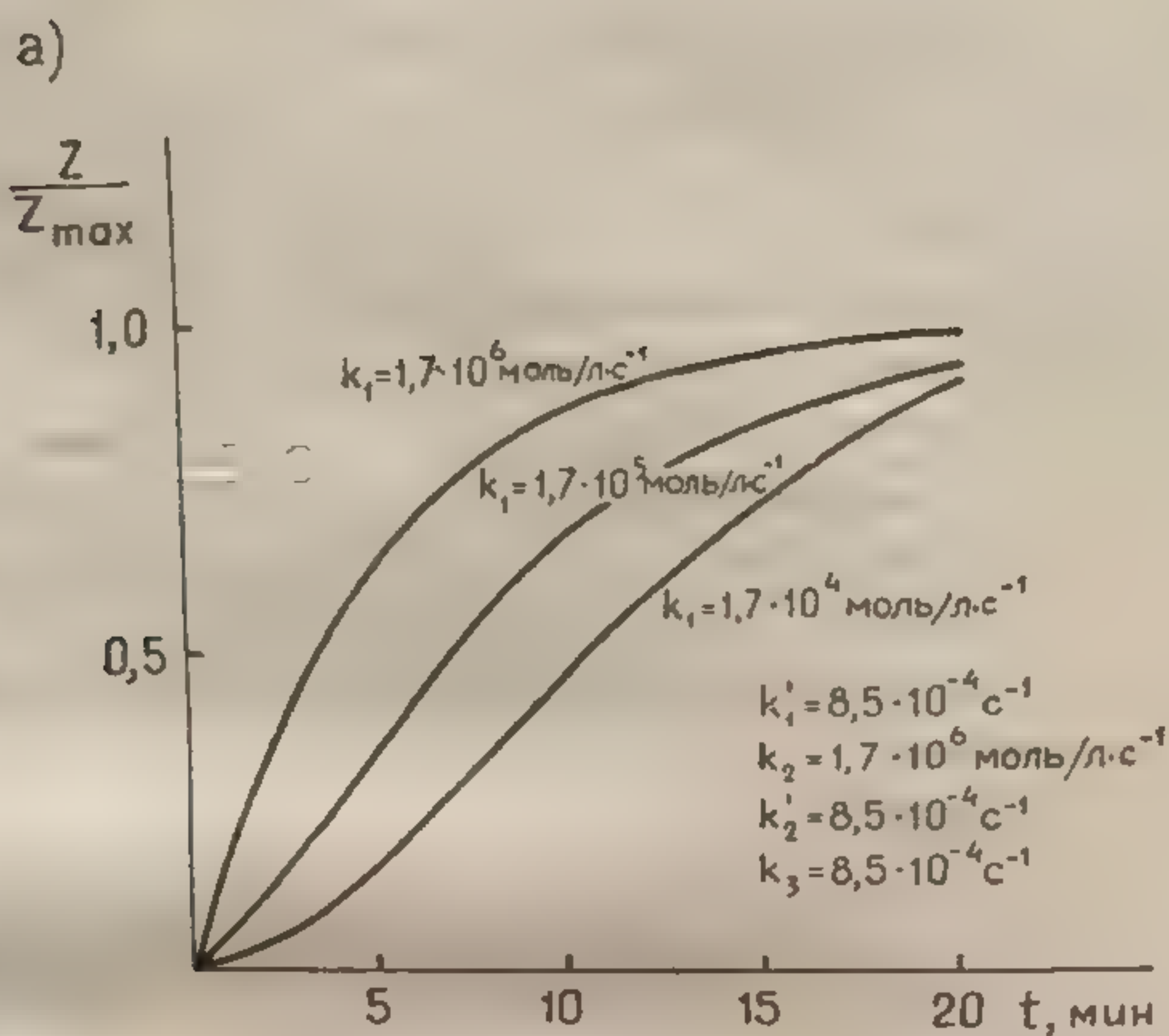


Рис. 2.8. Временная зависимость процесса связывания ангиотензина тканями.
 а — рассчитано с помощью уравнения (2.2.3),
 б — связывание меченого ангиотензина тканью аорты кролика [81].

Форма экспериментальной зависимости отклоняется от кривой вида (2.1.2), однако и в этом случае надежную дискриминацию произвести невозможно. Гораздо более наглядной демонстрацией роли фактора диффузии в определении кинетики образования гормон-рецепторного комплекса является установленная в работе [204] температурная зависимость величины специфического связывания в течение 10 минут инкубации ткани с меченым гормоном. Как явствует из рис. 2.9, при 10°С за

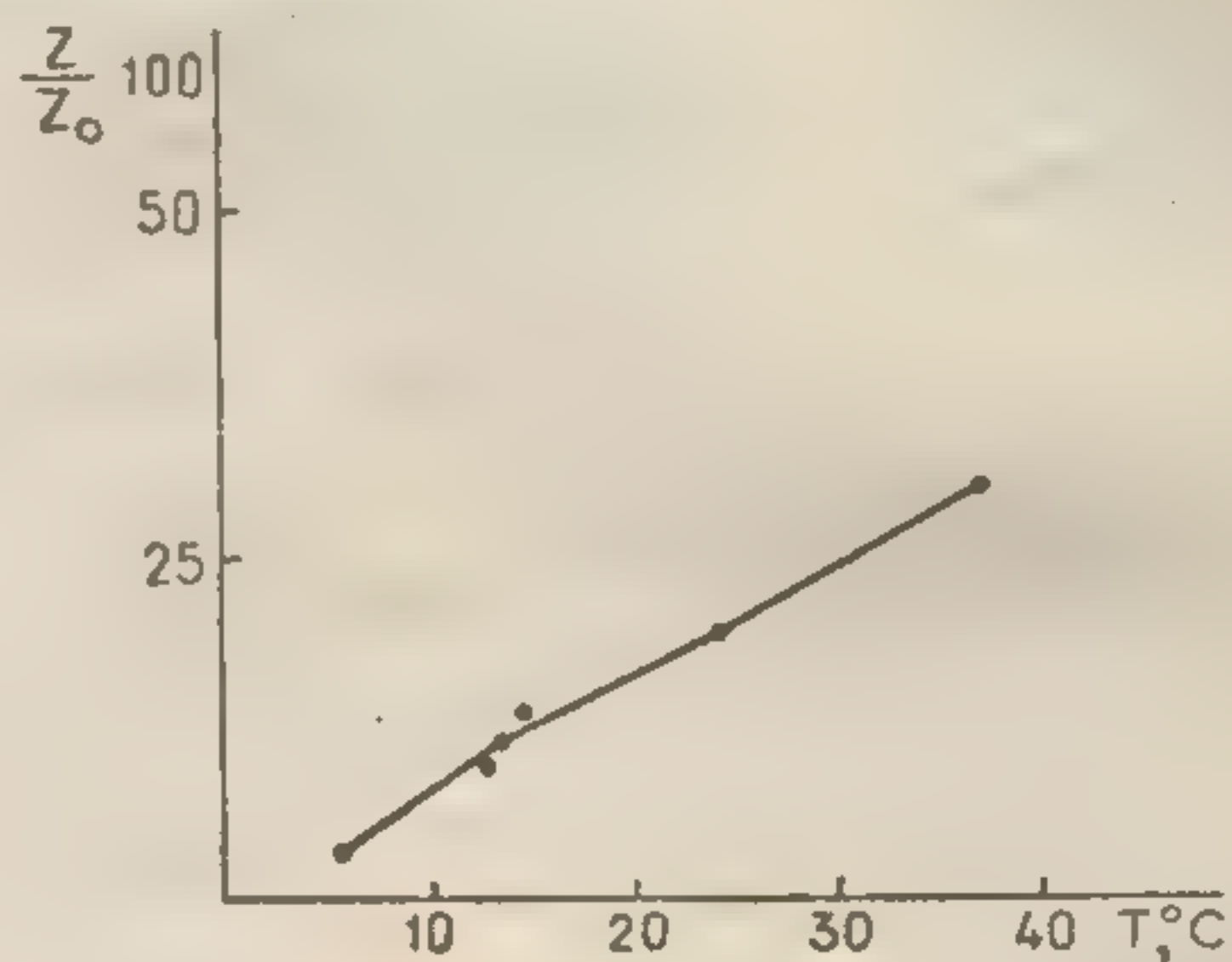


Рис. 2.9. Температурная зависимость величины специфического связывания меченого ангиотензина срезами матки крысы после 10-минутной инкубации [204].

этот период специфическое связывание достигает лишь примерно 50% стационарного уровня. С повышением температуры значения z ($t=10$ мин) увеличиваются, как это и предсказывается уравнением (2.2.3). К сожалению, на основании данных работы [204] нельзя обнаружить другого ожидаемого эффекта повышения температуры — некоторого снижения стационарных значений z , которое наблюдается, например, в упоминавшихся экспериментах Бодуэн с соавт. [81].

Приведенные соображения характеризуют смысл и масштабы ограничений, касающихся первого постулата оккупационной теории. В отношении стационарных зависимостей эти ограничения, как упоминалось, малосущественны; вытекающие отсюда проблемы, связанные с трактовкой кинетических закономерностей, будут обсуждены ниже.

Гораздо большие трудности возникают на пути обоснования второго постулата — линейной зависимости реакции от числа занятых рецепторов. Предпринятая в работе [272] попытка обоснования этого утверждения неубедительна. Авторами этой работы было показано, что наблюдаемые на опыте зависимости сократительной реакции полоски аорты кролика и полоски желудка крысы от примененной концентрации ангиотензина (рис. 2.10) с хорошей степенью точности описывались соотношением вида (2.1.1). Отсюда, однако, совершенно не следует, что реакция пропорциональна количеству гормон-рецеп-

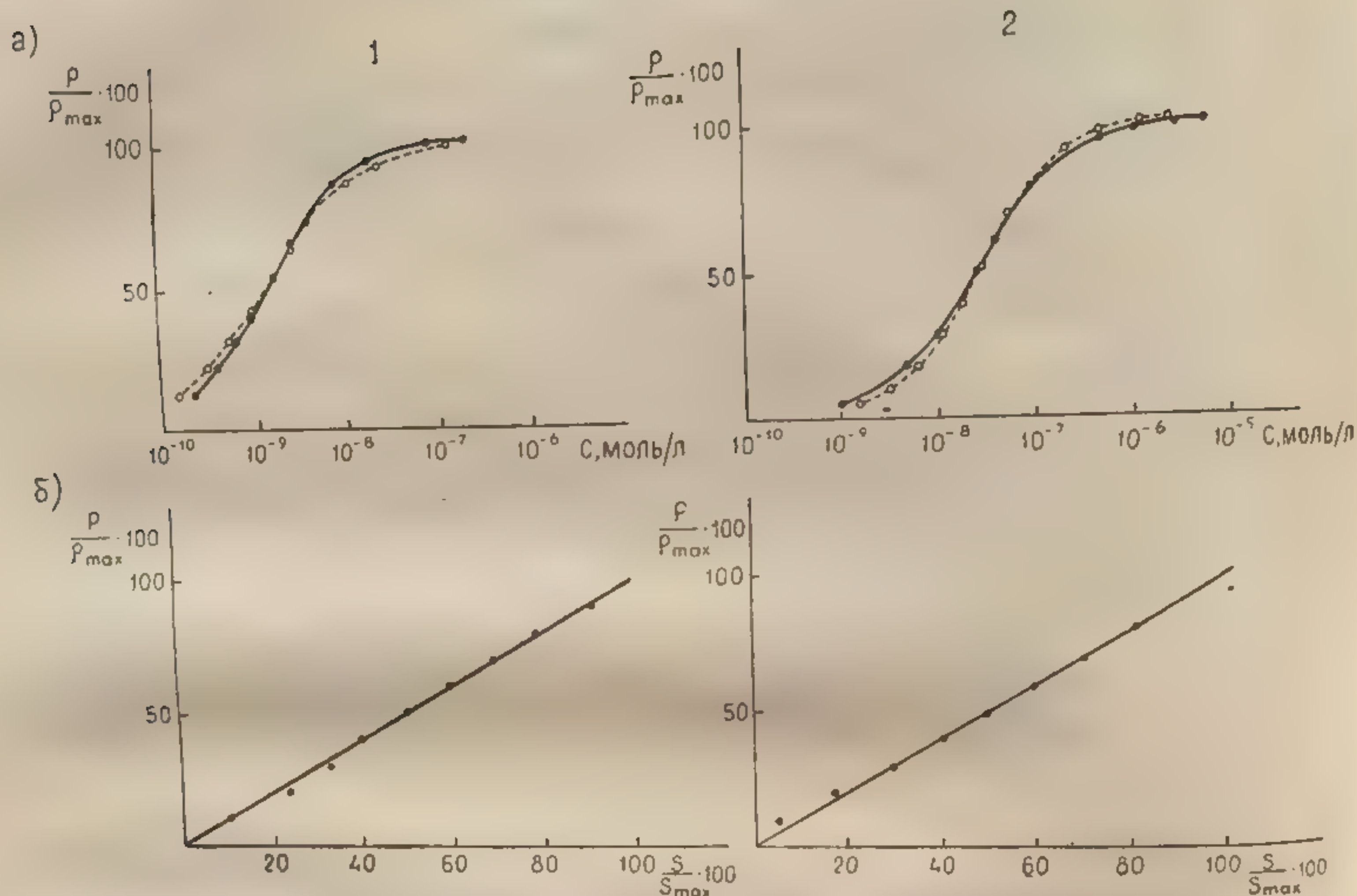


Рис. 2.10. Аппроксимация уравнением вида (2.1.1) экспериментально найденных зависимостей $p(C)$ (а); те же зависимости, представленные в координатах «реакция—сигнал» (б). 1 — полоска аорты кролика, 2 — полоска желудка крысы [272].

торных комплексов. Пример, иллюстрирующий это наиболее наглядным образом, был приведен еще Фурхготтом [155]. Предположим, что образование комплекса «агонист—рецептор» (с константой равновесия K_1) вызывает выделение внутрь некоторого клеточного компартмента определенного медиатора, причем его количество пропорционально числу z_1 образовавшихся комплексов. Процесс ассоциации молекул медиатора с соответствующими внутриклеточными рецепторами (константа равновесия K_2) снова опишется изотермой Лэнгмюра, а реакция будет пропорциональна числу z_2 комплексов «медиатор—рецептор». Представляя эту реакцию в виде функции примененной концентрации агониста C , имеем

$$p = \alpha z_2 = \frac{\alpha \beta z_1}{K_2 + \beta z_1} =$$

Таким образом форму (2.1.1), хотя и не линейной, можно от (2.1.1) ожидать, что будет задана в ви

Заметим, что представляемая законом Лэнгмюра зависимость $p(z)$, представляющая собой кривую, лежащую между ними носит

С, моль/л	Аппр
$5.00 \cdot 10^{-10}$	
$2.00 \cdot 10^{-9}$	
$8.00 \cdot 10^{-9}$	
$3.20 \cdot 10^{-8}$	
$1.28 \cdot 10^{-7}$	
$5.12 \cdot 10^{-7}$	

Таким образом зависимость $p(C)$ может

$$= \frac{\alpha\beta \left(\frac{z_1^{\max} C}{K_1 + C} \right)}{K_2 + \beta \left(\frac{z_1^{\max} C}{K_1 + C} \right)} = \frac{\left(\frac{\alpha\beta z_1^{\max}}{K_2 + \beta z_1^{\max}} \right) C}{\frac{K_1 K_2}{K_2 + \beta z_1^{\max}} + C}. \quad (2.2.4)$$

Таким образом, зависимость $\rho(C)$ в точности сохранит форму (2.1.1), хотя связь между сигналом и реакцией оказывается не линейной, а гиперболической. Практически неотличимой от (2.1.1) окажется ее форма и в тех случаях, когда $\rho(z)$ будет задана в виде, например, одной из следующих функций:

$$\rho = A(1 - e^{-\gamma z}), \quad (2.2.5)$$

$$\rho = A\sqrt{z}, \quad (2.2.6)$$

$$\rho = A \ln(1 + \gamma z). \quad (2.2.7)$$

Заметим, что последняя форма представления $\rho(z)$, оправдываемая законом Вебера—Фехнера, использовалась для анализа некоторых эндокринологических зависимостей [1, 25].

Зависимости $\rho(t)$, соответствующие трем типам функции $\rho(z)$, представлены в табл. 2.3 в сопоставлении с аппроксимирующей кривой вида (2.1.1); можно убедиться, что различие между ними носит чисто символический характер.

Таблица 2.3

Аппроксимация соотношений (2.2.5) — (2.2.7)
гиперболами (2.1.1)

C, моль/л	(2.2.5)	(2.1.1)	(2.2.6)	(2.1.1)	(2.2.7)	(2.1.1)
$5,00 \cdot 10^{-10}$	0,074	0,076	0,067	0,066	0,218	0,141
$2,00 \cdot 10^{-9}$	0,245	0,248	0,222	0,220	0,408	0,393
$8,00 \cdot 10^{-9}$	0,574	0,572	0,530	0,530	0,666	0,710
$3,20 \cdot 10^{-8}$	0,853	0,849	0,817	0,818	0,872	0,888
$1,28 \cdot 10^{-7}$	0,967	0,966	0,946	0,946	0,963	0,948
$5,12 \cdot 10^{-7}$	1,000	1,001	0,986	0,985	0,990	0,964

Таким образом, соответствие экспериментальных кривых $\rho(C)$ зависимостям типа (2.1.1) критерием линейности $\rho(z)$ служить не могут. В сущности, речь идет даже не о проверке

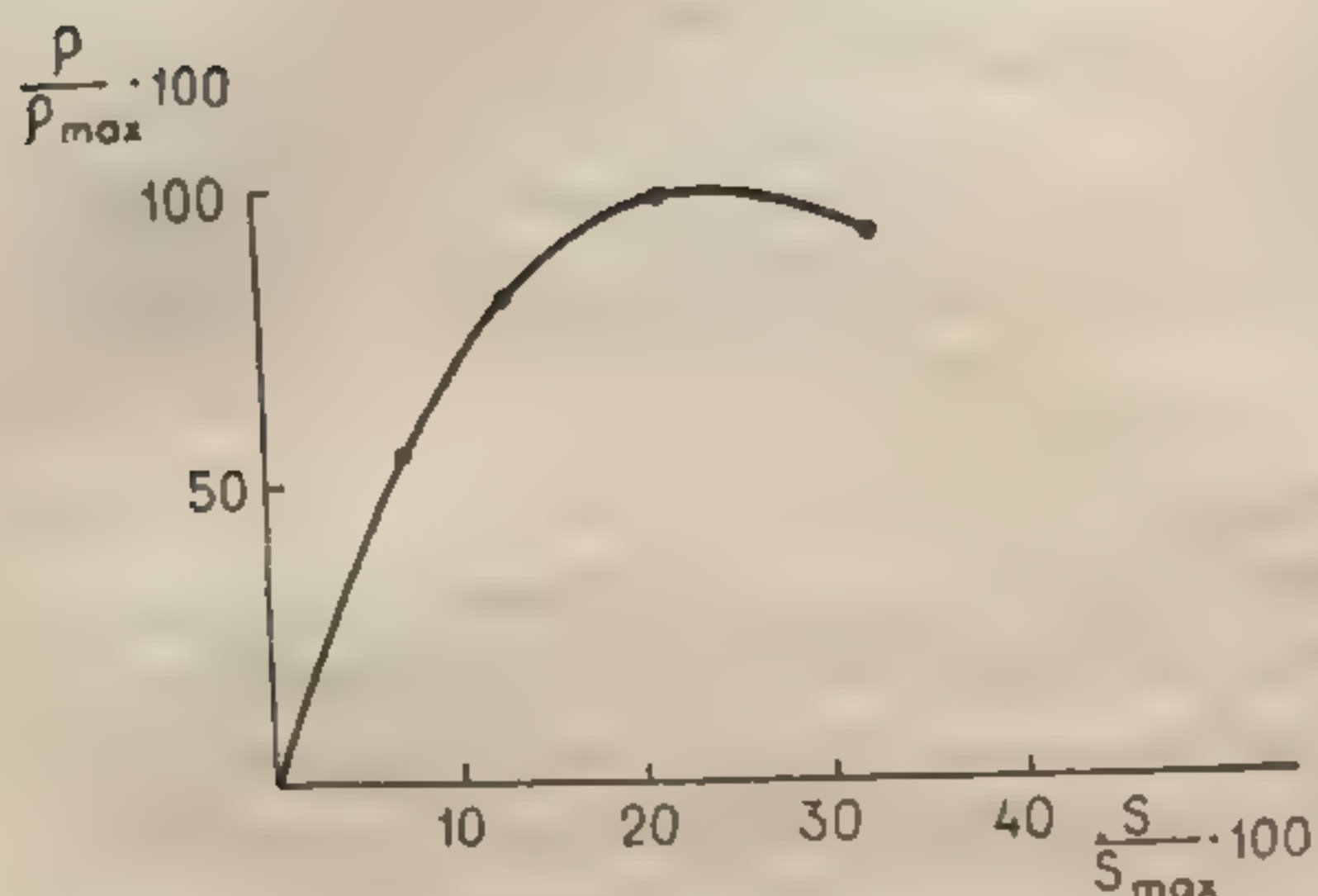


Рис. 2.11. Оценка формы зависимости $\rho(z)$ на основе сопоставления сократительной реакции матки крысы и величины специфического связывания меченого ангиотензина [204].

матки крысы на ангиотензин и поглощения срезами матки ^{125}I -ангиотензина, они обнаружили, что для первого процесса характерно значительно меньшее время выхода на стационарный уровень. Если соотнести величинам z соответствующие по времени значения уровня специфического связывания гормона, окажется, что зависимость $\rho(z)$ должна иметь форму, представленную на рис. 2.11. Другое указание на форму этой зависимости можно получить, сравнивая величины $pK_d = -\lg K$, характеризующие специфическое связывание гормона, со значениями pD_2 , соответствующими тем же тканям.

Как убеждает уравнение (2.2.4), в случае, если функция $\rho(z)$ имеет форму гиперболы типа (2.1.1), pK_d окажется меньше pD_2 ; можно показать, что это отношение сохранится, если $\rho(z)$ будет любой выпуклой функцией. В табл. 2.4 сравниваются известные в настоящее время оценки такого рода; к сожалению, на основании данных этой таблицы не может быть однозначно решен вопрос о выполнении условия

$$ED_{50} < K_d, \quad (2.2.8)$$

поскольку различия между обеими величинами имеют порядок ошибки эксперимента.

С обсуждаемой проблемой непосредственно связан вопрос о наличии «резервного пула» рецепторов ангиотензина. Зави-

факта линейности функции $\rho(z)$ (большинство исследователей относятся к гипотезе линейности скептически), а скорее об установлении формы этой зависимости.

С другой стороны, прямое экспериментальное исследование здесь весьма затруднено. Некоторой основой для суждения о характере функции $\rho(z)$ могут служить эксперименты Лина и Гудфренда [204]. Сравнивая кинетику развития сократительной реакции

самость $\rho(z)$, представ
ствование рецепторного
Регули с соавт. [272].
тезис в концентрации
тельно кратковременны
сигнальной реакции по
(рис. 2.12), что автора
работы истолковывает
как признак отсутстви
рецепторного резерв
Этот эффект, однако,
удалось воспроизвести
полоске висцеральной
дате, в которой кры
тах содержания ука
прежних данных, на
торных резервов, на
мер, на галактич муск
ной мышечной обол
[332].

* Биологическая
кальция.

Аорта кролика
ка)
Аорта кролика (ме
сомальная фракци
Матка крысы (фрак
плазматических
бран)
Аорта морской св
(фракция плазмат
ских мембран)

Рецепторы ангиотензина

Таблица 2.4

Сопоставление констант диссоциации меченого ангиотензина с величинами ED_{50}

Препарат	K_d , 10^{-8} моль/л	ED_{50} , 10^{-8} моль/л	Литератур- ный источ- ник
Аорта кролика (полос- ка)	1,3	1,5	[81]
Аорта кролика (микро- сомальная фракция)	5,5	2,3*	[96]
Матка крысы (фракция плазматических мем- бран)	2,0	1,2	[75]
Аорта морской свинки (фракция плазматиче- ских мембран)	2,2—4,7	6,3	[200]

* Биологическая реакция измерялась по высвобождению кальция.

симось $\rho(z)$, представленная на рис. 2.11, указывает на существование рецепторного резерва; с другой стороны, по данным Реголи с соавт. [272], сильный антагонист $[Sar^1, Leu^8]$ -ангиотензин в концентрации $2,5 \cdot 10^{-9}$ моль/л вызывал (в сравнительно кратковременных экспериментах) снижение уровня максимальной реакции полоски аорты кролика на ангиотензин (рис. 2.12), что авторами работы истолковывается как признак отсутствия рецепторного резерва. Этот эффект, однако, не удалось воспроизвести на полоске желудка крысы; далее, в некоторых работах содержится указание на различные косвенные признаки наличия рецепторного резерва, например, на гладкой мускулатуре восходящей ободочной кишки крысы [332].

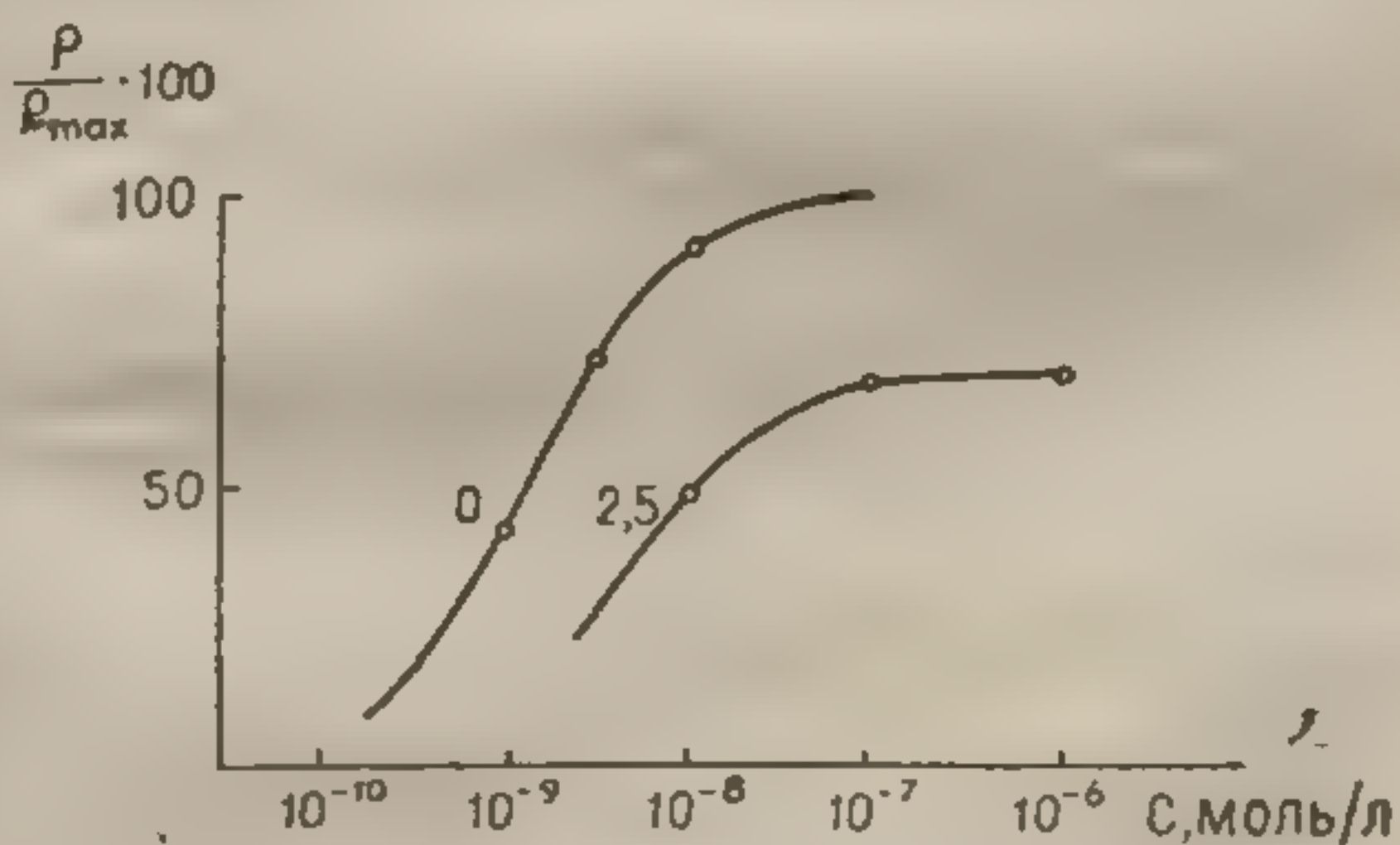


Рис. 2.12. Снижение антагонистом $[Sar^1, Leu^8]$ -АТ величины максимальной реакции полоски аорты кролика на ангиотензин (концентрация 10^{-9} моль/л) [272].

Возвращаясь к вопросу об исследовании формы зависимости $\rho(z)$, отметим, что даже корректная постановка этой задачи до сих пор не была осуществлена, причем это относится не только к ангиотензину. Строго говоря, реакция изолированного органа или ткани с учетом эффектов запаздывания, тахифилаксии и т. п. должна рассматриваться как сложная зависимость вида

$$\rho = \Phi \left[\int_0^t \varphi(\rho, \tau) d\tau, \int_0^t f(C, \tau) d\tau, t, C \right]. \quad (2.2.9)$$

Это обстоятельство нужно иметь в виду прежде всего при интерпретации кумулятивных кривых «доза—эффект» (КККЭ), а также экспериментальных данных по кинетике развития биологической реакции, в силу того что характерные времена процессов развития реакции на ангиотензин и вторичных явлений, оказывающих влияние на измеряемую реакцию, вполне соизмеримы. Таким образом, помимо очень сложной задачи построения адекватной модели действия ангиотензина, которая позволила бы получить уравнения

$$\rho = \Phi(C, t)$$

для определенных экспериментальных условий, возникает еще необходимость исключения вторичных эффектов. Разумеется, далеко не всегда можно ставить задачу блокирования этих эффектов в ходе эксперимента; более реальными могут оказаться попытки внесения соответствующих корректировок в результаты, получаемые традиционными средствами.

В настоящее время нет перспектив радикального разрешения этих проблем; в таких условиях единственным рациональным выходом оказываются методы, трактующие функцию $\rho(C, t)$ как эмпирическую зависимость, наделенную некоторыми свойствами достаточно общего характера, и позволяющие реализовать на этой основе некоторые сравнительные оценки.

Кривые «доза—эффект» обычно рассматриваются как стационарные концентрационные зависимости

$$\rho(C) = \rho(C, t = \infty),$$

что является естественным условием использования уравнений вида

$$\rho(C) = \frac{\alpha C}{K + C} \quad (2.2.10)$$

и вообще

Проблема.
уровень реакц
действий срав
мере их роста
нотонным. а
крайне медлен
участок стаци
(рис. 2.13). В
вают развитие
торое может
развития непе

Эти эффек
у разных тест
кривые, отно
свидетельству
цию к стабил
концентрации
с соавт. [272
крашения по
10⁻⁶ моль/л.

На кривых
в наступлении
было сообщен
тензина с дос
соответствует
торым начина

Рис. 2.13. Сож
различные кон
5 · 10⁻⁶

и вообще

$$\rho = f \left(\frac{QC}{K+C} \right). \quad (2.2.11)$$

Проблема, однако, заключается в том, что стационарный уровень реакции устанавливается вполне надежно лишь при действии сравнительно низких концентраций ангиотензина; по мере их роста временное развитие реакции перестает быть монотонным, а новый стационарный уровень устанавливается крайне медленно. При дальнейшем увеличении дозы выделить участок стационарного поведения кривой $\rho(t)$ уже невозможно (рис. 2.13). Вторичные эффекты, подавляющие реакцию, успевают развиться прежде, чем препарат достигнет состояния, которое может рассматриваться как стационарное по критериям развития непосредственной реакции на ангиотензин.

Эти эффекты, по-видимому, в различной степени выражены у разных тестовых объектов. Так, представленные на рис. 2.13 кривые, относящиеся к восходящей ободочной кишке крысы, свидетельствуют о том, что этот препарат утрачивает тенденцию к стабилизации на достоверно ненулевом уровне уже при концентрации ангиотензина 10^{-8} моль/л, в то время как Рну с соавт. [272] сообщают о наступлении стабильного плато сокращения полоски аорты кролика при концентрациях свыше 10^{-6} моль/л.

На кривых «доза—эффект» описанные явления проявляются в наступлении парадоксальной фазы (рис. 2.14). Ни разу не было сообщено о получении кривой «доза—эффект» для ангиотензина с достоверно различными плато; наибольшая реакция соответствует узко локализованному максимуму кривой, за которым начинается спад — парадоксальная фаза.

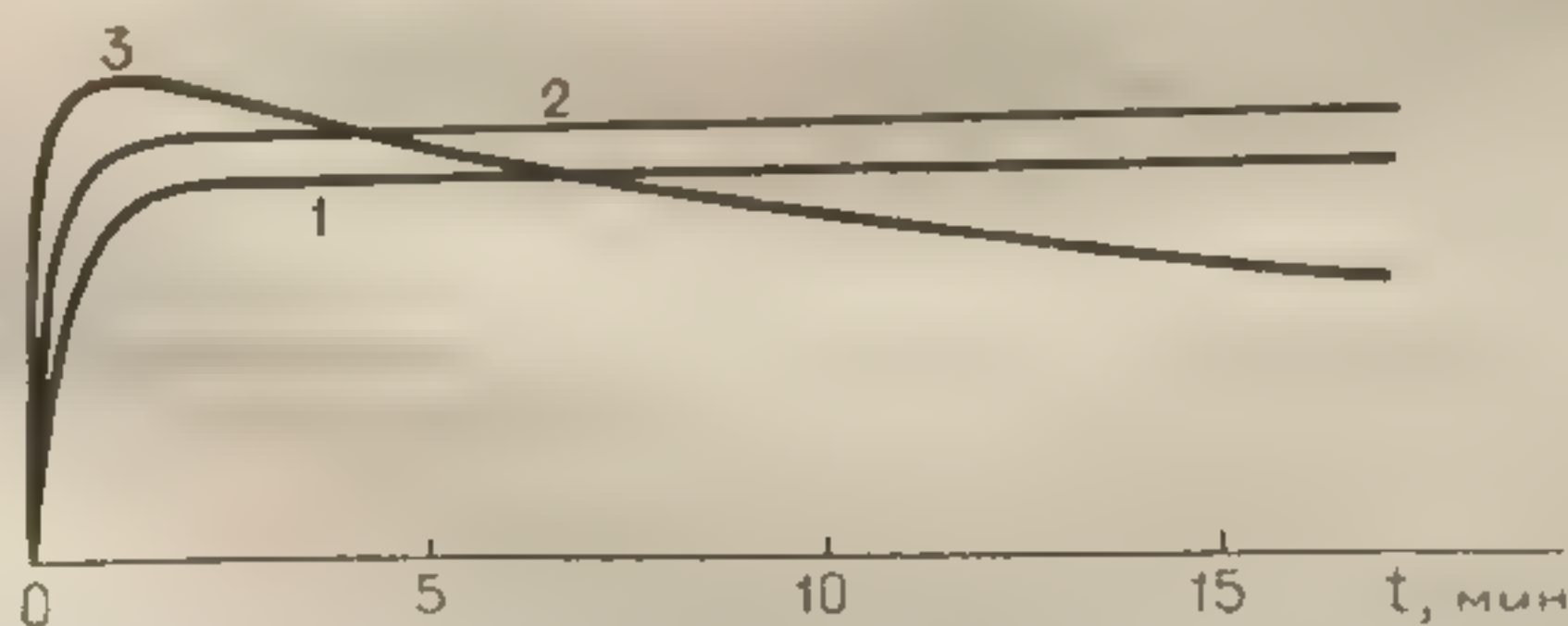


Рис. 2.13. Сократительная реакция восходящей ободочной кишки крысы на различные концентрации ангиотензина. Примененные концентрации: 1 — $5 \cdot 10^{-11}$ моль/л; 2 — $5 \cdot 10^{-10}$ моль/л; 3 — $5 \cdot 10^{-9}$ моль/л.

Обработке с помощью уравнения (2.2.10) во всех известных работах подвергается, очевидно, лишь восходящий участок кривой $\rho(C)$. Между тем подавляющие реакцию вторичные эффекты, развитие которых может в конечном счете также рассматриваться как функция примененной дозы, начинают проявляться уже при концентрациях, вызывающих эффект, далекий от максимального, существенно искажая форму кривой, в частности наклон ее центральной части. Схематически это можно проиллюстрировать с помощью представления зависимости «доза—эффект» в виде

$$\rho(C) = \alpha z(C) D(C), \quad (2.2.12)$$

где $D(C)$ — некий депрессирующий фактор, функция, имеющая форму, представленную на рис. 2.15. Депрессирующие эффекты начинают развиваться при сравнительно высоких дозах, поэтому форма начального участка кривой $\rho(C)$ совпадает с $\alpha z(C)$, однако в дальнейшем все более от нее отклоняется, причем в результате оказывается искаженной величина максимальной реакции. В этих условиях значения констант α и K ,

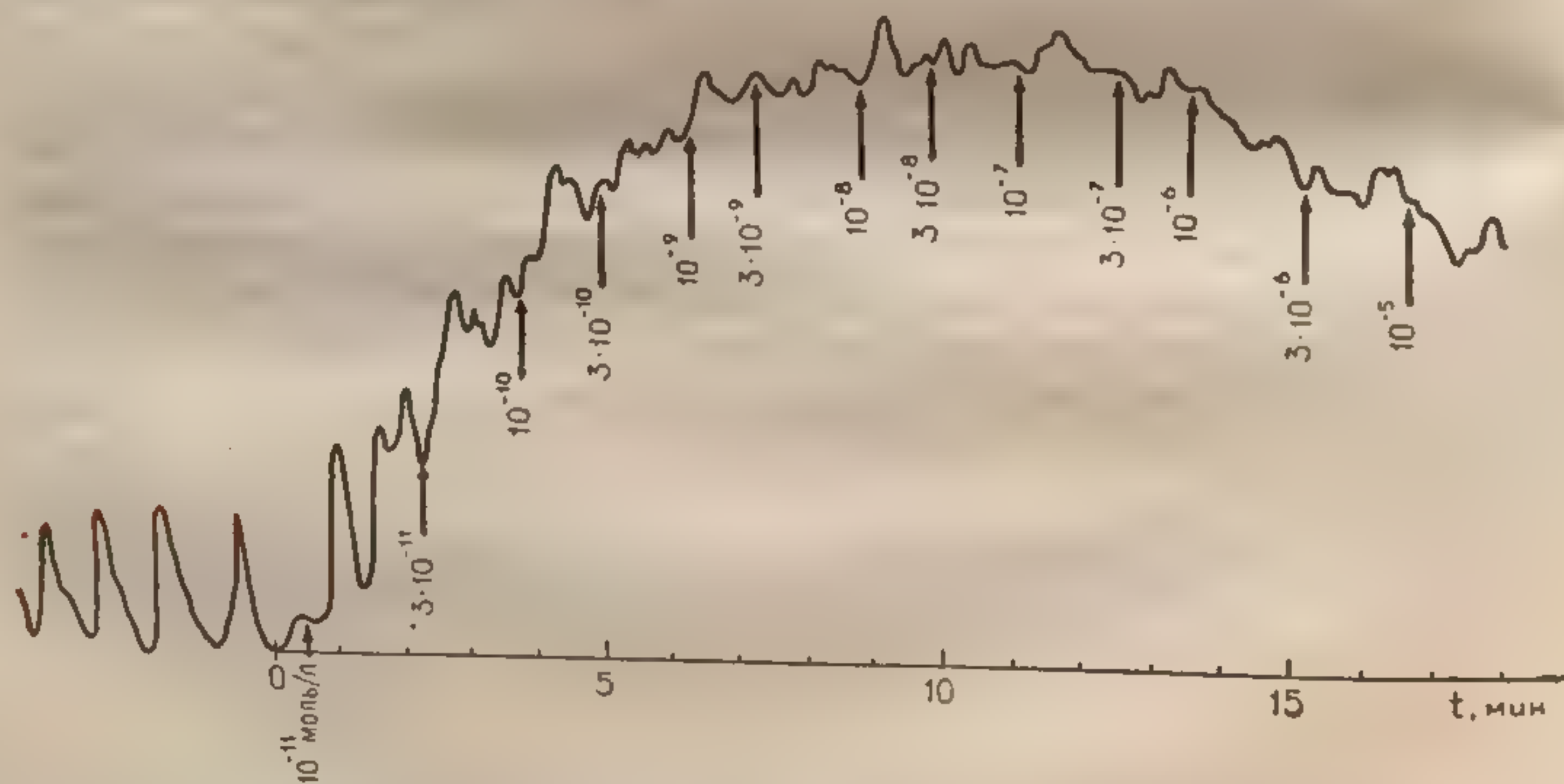


Рис. 2.14. Кумулятивная кривая «доза—эффект», описывающая реакцию восходящей ободочной кишки крысы на ангиотензин. Стрелки при кривой обозначают моменты увеличения концентрации ангиотензина (моль/л).

получаемые в результате аппроксимации восходящей части кривой уравнением (2.2.10), не имеют, очевидно, силы количественных оценок.

Трактовка кривых подобного рода в содержательно определенных терминах оказывается, однако, возможной в тех случаях, когда речь идет о сопоставлении некой пары кривых, соответствующих различным экспериментальным условиям. При этом используются следующие предположения:

1. Равной реакции соответствует равный сигнал, где под сигналом понимается величина, пропорциональная количеству гормон-рецепторных комплексов:

$$S(C) = \kappa z(C) = \frac{\kappa Q C}{K + C}. \quad (2.2.13)$$

2. Образование гормон-рецепторных комплексов не зависит от прочих процессов, лежащих в основе регистрируемой реакции.

3. При достаточно больших t вместо функции (2.2.9) можно рассматривать функцию $\rho(C)$, а с учетом условия (1)

$$\rho = f[z(C, t)t].$$

4. Функция $\rho(z)$ предполагается совпадающей в условиях сравниваемых экспериментов.

Согласно существующим представлениям о гормон-рецепторных механизмах, эти гипотезы выглядят в достаточной мере правдоподобными, хотя непосредственной экспериментальной проверке они, по-видимому, не подвергались, во всяком случае для ангиотензина.

В результате, располагая, например, кривыми, соответствующими некой паре агонистов, можно получить оценку отношения констант равновесия гормон-рецепторного комплекса. Действительно, в области

$$t \gg (k'_1 + k_1 C)^{-1} \quad (2.2.14)$$

величина z принимает стационарное значение; с другой стороны, согласно предположению (3), некоторое время спустя оказываются «забытыми» детали начальной фазы любого сечения $\rho(t)$. Таким образом, любое сечение $\rho(C)$ в области, определяемой этими условиями, дает зависимость, совпадающую

с точностью до масштаба абсциссы для всех агонистов, различающихся только константами равновесия K_1 и K_2 . Очевидно, в полулогарифмических координатах этот факт выразится сдвигом вдоль абсциссы на величину $\ln K_1/K_2$. Отметим, что этот результат не зависит от стехиометрии гормон-рецепторного комплекса, поскольку в случае комплекса структуры QA_n константа равновесия K также оказывается масштабным множителем при аргументе в выражении для стационарного уровня

$$z = \frac{Q(K^{-1}C)^n}{(1 + K^{-1}C)^n} \quad (2.2.15)$$

Тем самым, в отличие от абсолютных значений pD_2 , сдвиг этой величины ($\Delta pD_2 = pD'_2 - pD''_2$) может рассматриваться как оценка физико-химического параметра — разности энергий диссоциации

$$2, 3pD_2 = \left(\frac{\Delta F'}{RT} - \frac{\Delta F''}{RT} \right) \quad (2.2.16)$$

в той мере, в какой выполняются условия (2.2.11) и (2.2.14) и справедливы предположения (1) — (4).

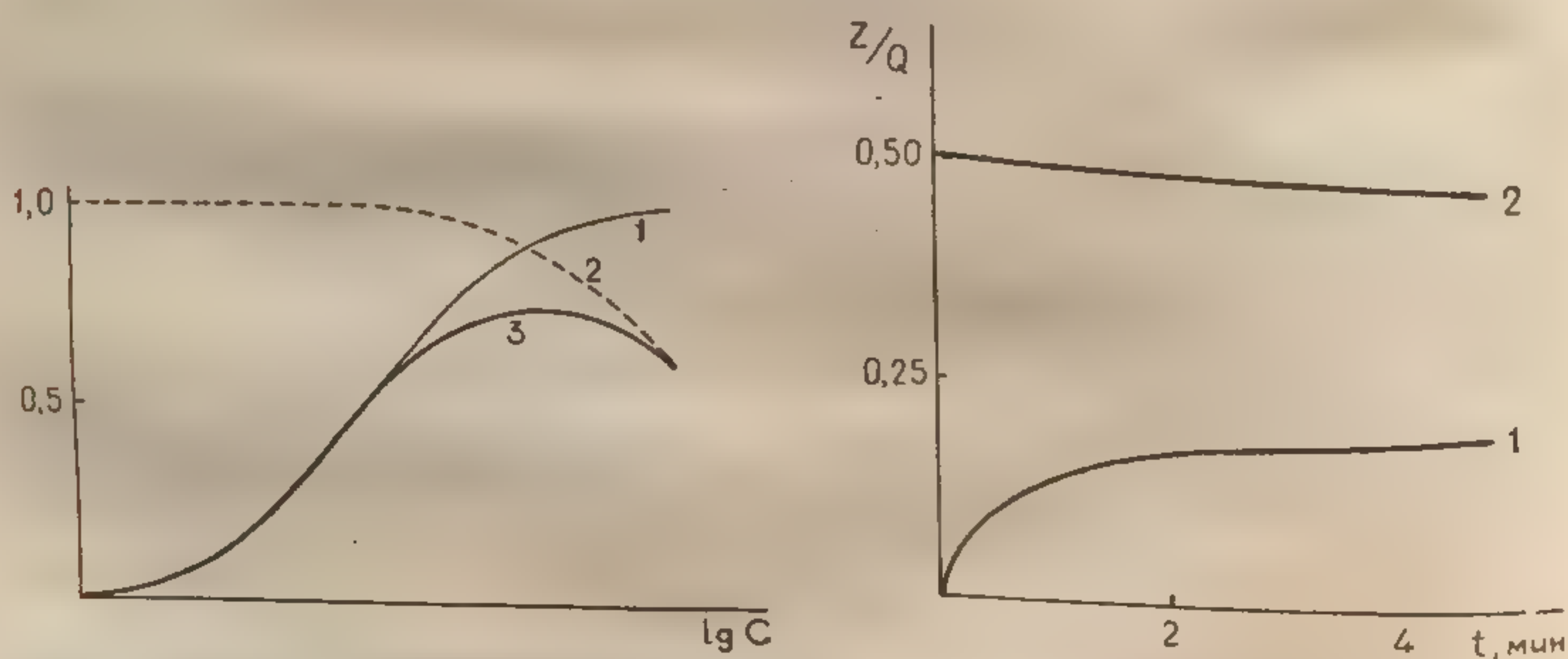


Рис. 2.15. К соотношению (2.2.12). 1 — $z(C)/z_{\max}$, 2 — $D(C)/D_{\max}$, 3 — $p(C)/p_{\max}$.

Рис. 2.16. Изменение во времени количества связанных с рецепторами молекул агониста (1) и антагониста (2). Рассчитано с помощью уравнения (2.2.20). $K=10^{-8}$ моль/л, $K_B=10^{-9}$ моль/л.

Рецепторы ангиотензина

В случае применения антагонистов на базе этих представлений оказывается возможным определение не относительных сдвигов, а абсолютных величин константы равновесия комплекса «антагонист—рецептор». Действительно,

$$z = \frac{QC}{C + K \left(1 + \frac{C_B}{K_B} \right)}, \quad (2.2.17)$$

где C_B — концентрация антагониста. Сравнивая кривые $p(C)$, полученные в отсутствие и в присутствии антагониста, из отношения концентраций агониста, вызывающих равную реакцию (концентрации C и C' соответственно), легко вычислить K_B :

$$K_B = \frac{C_B}{C'/C - 1}. \quad (2.2.18)$$

Очевидно, что определяемые стандартными приемами величины pA_2 совпадают (в рамках тех же допущений) с логарифмом константы равновесия pK_B .

В табл. 2.5 приведены оцененные таким образом значения pA_2 для ряда антагонистов ангиотензина.

Используя антагонисты, константа равновесия которых существенно больше, чем ангиотензина, можно, в принципе, получить также и оценки константы равновесия агониста K ; для этого может быть использован прием, базирующийся на гипотезе «необратимого ингибирования» [327].

Поскольку в этом случае $k'_2 \gg k'_1$, процесс замещения молекул антагониста, связанных с рецептором, будет протекать весьма медленно сравнительно с ходом установления равновесия в системе «аго-

Таблица 2.5

Значения pA_2 для некоторых антагонистов ангиотензина [324]

Антагонист	pA_2
[Ala ⁸]-AT	8,32
[Asn ¹ , Val ⁵ , Ala ⁸]-AT	6,84
[Asn ¹ , Val ⁵ , Val ⁸]-AT	8,31
[Leu ⁸]-AT	8,09
[Asn ¹ , Val ⁵ , Leu ⁸]-AT	8,26
[Ile ⁸]-AT	9,21
[Asn ¹ , Val ⁵ , Gly ⁸]-AT	6,54
[Asn ¹ , Val ⁵ , β-Ala ⁸]-AT	5,08
[Asn ¹ , Val ⁵ , Abu ⁸]-AT	7,93
[Suc ¹ , Ala ⁸]-AT	7,01
[Sar ¹ , Val ⁵ , Ala ⁸]-AT	8,61
[Sar ¹ , Ile ⁸]-AT	9,33
[Pro ³]-AT	6,87
[Pro ³ , D-His ⁶]-AT	7,01
[Ala ⁴ , Ile ⁸]-AT	6,65
[Ala ⁴ , D-His ⁶ , Ile ⁸]-AT	6,53

нист—свободные рецепторы». Соответствующие уравнения имеют вид

$$\begin{aligned}\frac{dz}{dt} &= k_1 C (Q - z - \zeta) - k'_1 z, \\ \frac{d\zeta}{dt} &= k_2 C_B (Q - z - \zeta) - k'_2 \zeta,\end{aligned}\quad (2.2.19)$$

где ζ — количество рецепторов, связанных с антагонистом, а решение при начальных условиях

$$z|_{t=0} = 0; \quad \zeta|_{t=0} = \frac{QC_B}{C_B + K_B} = \zeta_0$$

выразится в виде

$$z = D - Ee^{-\beta_1 t} - Fe^{-\beta_2 t}, \quad (2.2.20)$$

где

$$\beta_{1,2} = \frac{1}{2} \left[k_1 C + k_2 C_B + k'_1 + k'_2 \pm \sqrt{(k_1 C + k_2 C_B + k'_1 + k'_2)^2 - 4(KC + K_B C_B + KK_B)} \right],$$

$$D = \frac{QC}{C + K(1 + C_B/K_B)},$$

$$E = \frac{\beta_2}{\beta_2 - \beta_1} D - \frac{1}{\beta_2 - \beta_1} \frac{QCk_1}{1 + C_B/K_B},$$

$$F = -\frac{\beta_1}{\beta_2 - \beta_1} D + \frac{1}{\beta_2 - \beta_1} \frac{QCk_1}{1 + C_B/K_B}.$$

Таким образом, за время достижения квазистационарного уровня z величина ζ практически не успевает измениться (рис. 2.16), так что в первом приближении можно считать ее не зависящей от концентрации агониста C . Сравнивая концентрации C и C' , вызывающие равный эффект в присутствии и в отсутствие антагониста, и полагая, как и раньше, что из $\rho(z) = \rho(z')$ следует $z = z'$, получаем

$$\frac{C'}{C} = \left(1 - \frac{\zeta_0}{Q} \right) - \frac{\zeta_0}{KQ} C'. \quad (2.2.21)$$

Располагая парой кривых $\rho(C)$ и $\rho(C')$, с помощью (2.2.21) можно оценить величины $\frac{\xi_0}{Q}$ и K . Попытка такого рода была предпринята Реголи с соавт. [236], использовавшими антагонист $[\text{Sar}^1, \text{Leu}^8]$ -ангиотензин. На рис. 2.17 приведен полученный ими график зависимости $\frac{C'}{C}$ (C'). Судя по приведенным в работе данным, соотношения (2.2.21) в этом случае удовлетворяются. Полученная оценка pK_d (7,75) оказалась довольно близкой pD_2 (8,07). Отметим, впрочем, что точки на этом графике соответствуют очень узкому интервалу значений концентрации C (между $3 \cdot 10^{-9}$ и $5 \cdot 10^{-9}$ моль/л), так что надежное определение наклона прямой вряд ли возможно.

Рассмотренные приемы, разумеется, не в состоянии заменить прямых измерений физико-химических констант, характеризующих взаимодействие молекулы ангиотензина с рецептором; принимая во внимание обилие подчас весьма зыбких предположений, положенных в их основу, к получаемым таким образом результатам следует относиться с известной осторожностью. В еще большей степени это замечание относится к кумулятивным кривым «доза—эффект». При отсутствии надежных сведений о кинетике развития реакции тестового объекта на ангиотензин расшифровка кривых, отражающих реакцию на постоянно увеличивающиеся дозы, практически невозможна, тем более что момент применения всякой последующей (большей) дозы определяется глазомерной оценкой достижения стационарного уровня. Принятые в практике испытаний активности ангиотензина и его аналогов временные интервалы увеличения дозы (обычно несколько минут) не позволяют достоверно зафиксировать факт выхода на плато, особенно при наличии спонтанной активности (см. рис. 2.14).

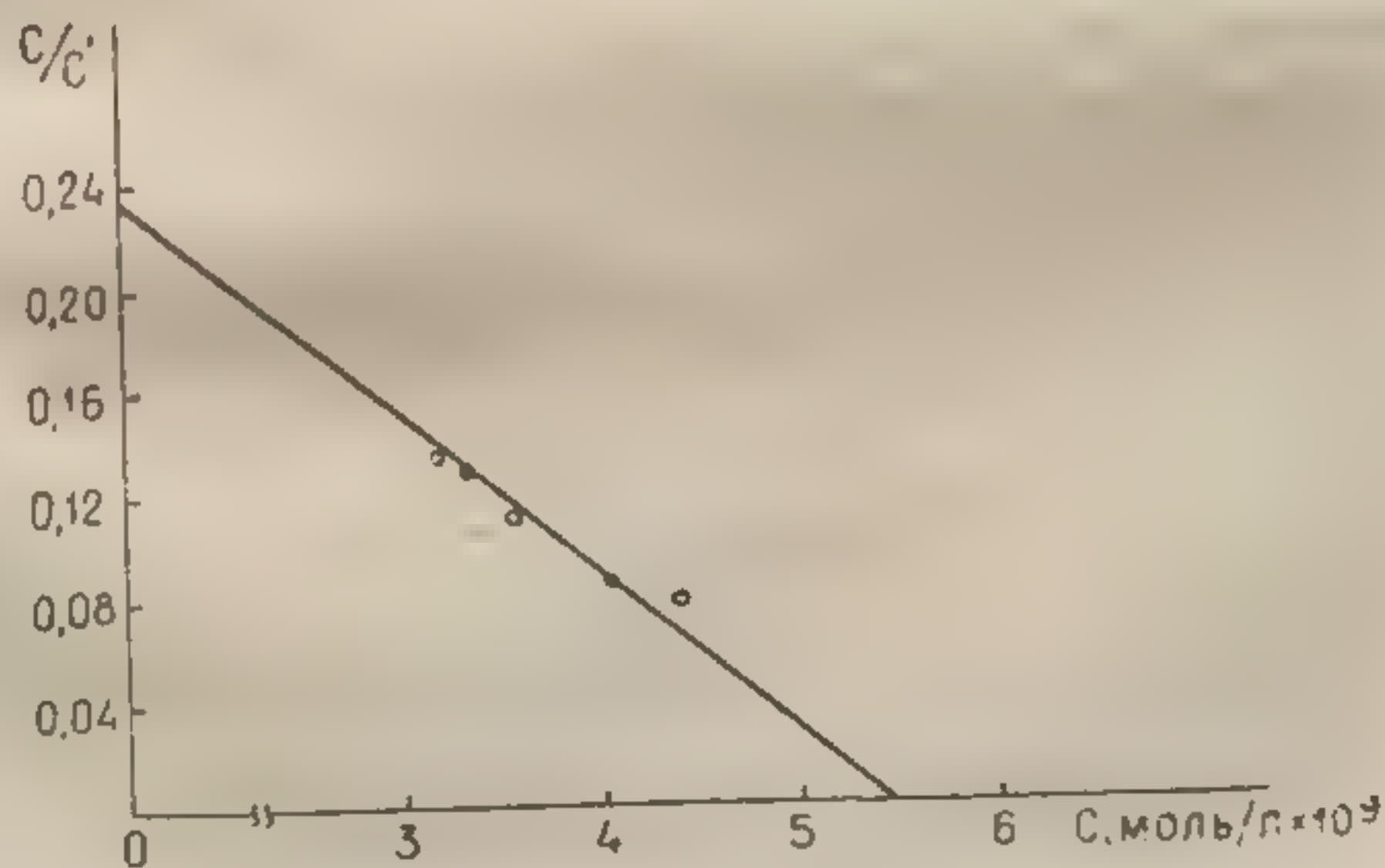


Рис. 2.17. Оценка параметров уравнения (2.2.21) [263].

Оценки, получаемые на основании кумулятивных кривых, могут рассматриваться лишь как качественные индикаторы определенных тенденций. Разработка для их построения корректного регламента испытательной процедуры, базирующегося на кинетических моделях развития реакции, не только чрезвычайно трудна, но и вряд ли оправдана, поскольку с учетом значительного варьирования регистрируемых величин на этом пути может быть получен лишь символический выигрыш в однородности испытаний по сравнению с общепринятым (увы!) определением момента увеличения дозы согласно интуиции экспериментатора.

Рассмотренные выше ограничения возможностей интерпретации стационарных зависимостей сохраняют силу и в отношении анализа кинетических кривых. По той же причине — из-за неопределенности формы зависимости $\rho(z)$ — в общем случае оказывается невозможным вычисление на основе экспериментальных кривых кинетических констант, входящих в уравнения (2.1.2) и (2.1.1). Получение оценок такого рода может быть, однако, реализовано в некоторых частных случаях. Можно, например, использовать то обстоятельство, что при $z=0$ $\rho=0$ и, следовательно, при очень малых концентрациях условие линейности

$$\rho \approx az \quad (2.2.22)$$

должно выполняться. Критерием «малости» могут служить соотношения, связывающие константы, входящие в уравнения типа (2.1.2) или (2.2.3). Располагая парой кривых $\rho(t)$, соответствующих различным (по предположению, «малым») дозам, можно получить оценки констант уравнения (2.1.2) в форме

$$\rho(t) = A(1 - e^{-\beta t}). \quad (2.2.23)$$

Поскольку

$$A_1 = \frac{aQC_1k_1}{\beta_1}, \quad A_2 = \frac{aQC_2k_1}{\beta_2};$$

$$\beta_1 = k'_1 + k_1C_1, \quad \beta_2 = k'_1 + k_1C_2,$$

должно выполняться условие

$$\frac{A_1\beta_1}{A_2\beta_2} = \frac{C_1}{C_2}. \quad (2.2.24)$$

Если функция $\rho(z)$ является, как предполагалось, выпуклой и монотонной, так что

$$\rho(\gamma z)/\rho(z) < \gamma, \quad (2.2.25)$$

форма зависимости $\rho(t)$ при малых дозах всегда окажется достаточно близкой к виду (2.2.23), и на этом основании нельзя судить о выполнении условия (2.2.22). С другой стороны, используя оценки коэффициентов аппроксимирующего уравнения (2.2.23), соответствующие разным C_i , можно сделать заключение о форме зависимости $\rho(z)$; нетрудно убедиться, что из (2.2.25) следует

$$\frac{A_1\beta_1}{A_2\beta_2} < \frac{C_1}{C_2} \quad \text{при} \quad C_1 > C_2.$$

На рис. 2.18, а приведены кривые развития сократительной реакции восходящей ободочной кишки крысы на две дозы ангиотензина — $5 \cdot 10^{-11}$ и $5 \cdot 10^{-10}$ моль/л. Соответствующее этой паре кривых значение величины

$$\varepsilon = \frac{A_1\beta_1}{A_2\beta_2}$$

оказалось равным 1,8 вместо 10. Этот показатель обнаружил значительную индивидуальную вариабельность, изменяясь в пределах 1,5—6,0, однако во всех случаях оставаясь менее 10.

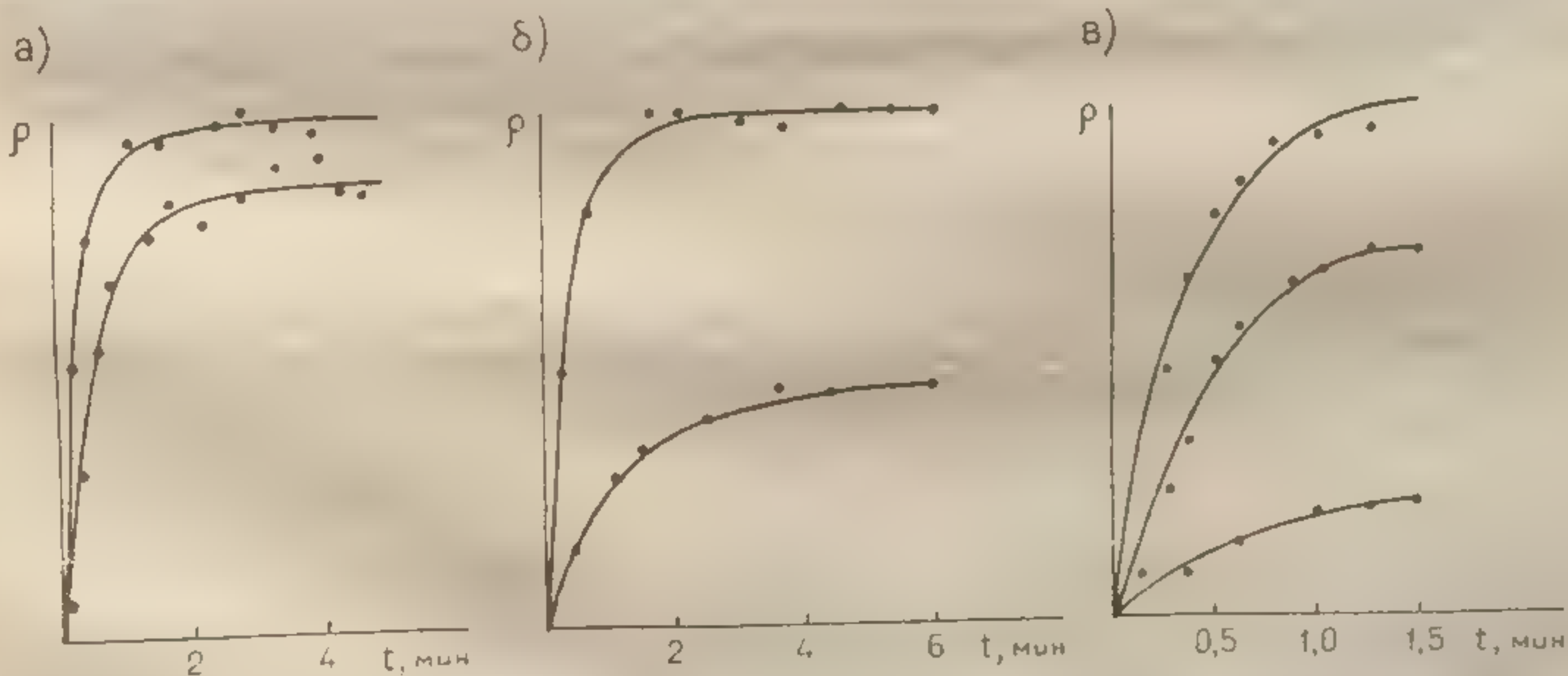


Рис. 2.18. Развитие сократительной реакции гладкой мускулатуры на низкие концентрации ангиотензина.

а — восходящая ободочная кишка крысы, концентрации $5 \cdot 10^{-11}$ и $5 \cdot 10^{-10}$ моль/л; б — восходящая ободочная кишка крысы, концентрации 10^{-11} и $5 \cdot 10^{-11}$ моль/л; в — аорта кролика, концентрации $4,5 \cdot 10^{-10}$, $2,25 \cdot 10^{-9}$ и $4,5 \cdot 10^{-9}$ моль/л [219].

Таким образом, подтверждается справедливость упоминавшихся выше предположений о характере зависимости $\rho(z)$.

Теоретически всегда можно подобрать две достаточно малые дозы, для которых соотношение (2.2.22) будет справедливо в том случае, если кинетика связывания ангиотензина рецепторами действительно подчиняется уравнению (2.1.2); на практике, однако, может оказаться, что области его выполнения соответствует столь незначительная реакция, что получение и сопоставление оценок параметров k_1 и k'_1 станет невозможным.

Отметим, что границы этой области определяются формой функции $\rho(z)$, обнаруживающей значительную индивидуальную вариабельность, однако сам процесс связывания (в пренебрежении эффектами диффузии) характеризуется сравнительно стабильными значениями констант k_1 и k'_1 , не зависящими от индивидуальных особенностей развития сократительной реакции. Благодаря этому результаты, полученные на образцах, удовлетворяющих условию (2.2.24), сохраняют общность даже и в том случае, если такие образцы оказываются сравнительно редкими в общей массе.

На рис. 2.18, б в качестве примера приведена пара кривых $\rho(t)$, удовлетворяющая условию (2.2.24); этот результат также получен на восходящей ободочной кишке крысы. В табл. 2.6 сопоставляются результаты индивидуальных оценок констант k_1 , k'_1 и pK_d . В той же таблице приведены результаты обработки кинетических кривых, полученных на полоске аорты кролика [219]. Они достаточно хорошо аппроксимируются уравнением (2.2.23); как убеждают данные табл. 2.6, оценочные зна-

Константы k_1 , k'_1 и K_d , оцененные из соотношений (2.2.23)

Ткань	Концентрации ангиотензина		ε	$10^8 k_1$, моль ⁻¹ · с ⁻¹
	C_1	C_2		
Аорта кролика*	$2,25 \cdot 10^{-9}$	$0,45 \cdot 10^{-9}$	4,7	0,56
	$4,5 \cdot 10^{-9}$	$0,45 \cdot 10^{-9}$	8,7	0,61
Восходящая ободочная кишка крысы**	$5 \cdot 10^{-11}$	$1 \cdot 10^{-11}$	$5,4 \pm 1,1$	$7,50 \pm 1,63$

* Рассчитано на основании кинетических кривых работы [219].

** Приводятся средние значения и среднеквадратические ошибки четы-

*** $pK_d = -\lg K_d$.

чения констант β и A с хорошей степенью точности подчиняются условию (2.2.24).

Величины констант k_1 , k'_1 и pK_d в случае аорты кролика оказываются близкими приводившимся ранее непосредственным оценкам; для восходящей ободочной кишки крысы — органа, заметно выделяющегося по характеру реакции на ангиотензин [262], такие оценки в настоящее время отсутствуют.

Возможности интерпретации кинетики вызываемого ангиотензином сокращения гладкой мускулатуры ограничены в гораздо большей степени, чем это имеет место в случае стационарных зависимостей. Модельные представления, привлекаемые для истолкования кинетических кривых, обычно достаточно сложны, и неопределенность структуры зависимости $\rho(z)$ оказывается в этом случае очень трудно преодолимым препятствием. Мы вернемся к этой проблеме в разделе 4.4 после рассмотрения основных механизмов, лежащих в основе развития реакции гладкой мускулатуры на ангиотензин.

* * *

Исследование взаимодействия ангиотензина с рецепторными структурами гладкомышечной клетки, вообще говоря, не исчерпывается кругом работ, обсуждавшихся в настоящей главе; здесь рассматривались лишь результаты, допускающие более или менее однозначную интерпретацию. Данные работ, в которых предпринимались попытки установления зависимости характера гормон-рецепторного взаимодействия от различных физико-химических факторов, в силу упоминавшихся выше обстоятельств (денатурация мембранных структур и т.п.) отягощены значительной неопределенностью, и представляется маловероятным, чтобы в ближайшее время удалось преодолеть трудности, стоящие на пути подходов, предполагающих модификацию рецепторных структур. Модификация же структуры молекулы гормона, будучи доступной в экспериментальном отношении, широко используется для изучения молекулярных механизмов гормон-рецепторного взаимодействия.

Таблица 2.6

$k'_1, \text{с}^{-1}$	pK^{***}_d
0,14	8,6
0,14	8,6
$0,013 \pm 0,002$	$10,7 \pm 0,7$

рех независимых измерений.

Глава

3

СТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ АНАЛОГОВ АНГИОТЕНЗИНА

Материал предыдущих двух глав убеждает в том, что различные аспекты молекулярных механизмов взаимодействия молекулы ангиотензина с рецепторами изучены в настоящее время с весьма неодинаковой степенью детализации. Если химические, структурные и конформационные возможности молекулы ангиотензина исследованы более или менее полно, то в отношении кинетики взаимодействия ангиотензина с рецепторами удастся получить лишь довольно расплывчатые сведения, с трудом поддающиеся однозначной интерпретации. Причины подобных затруднений подробно рассматривались ранее; здесь следует лишь отметить, что невозможность получения корректных количественных оценок характеристик процесса гормон-рецепторного взаимодействия с участием молекулы ангиотензина по необходимости влечет за собой изыскание методов и приемов качественных оценок.

Именно таким образом следует квалифицировать широко распространенные в настоящее время экспериментальные исследования особенностей развития биологической реакции под действием различных аналогов ангиотензина. Такой подход рассматривается ныне, особенно в случае пептидных гормонов, как один из наиболее перспективных для изучения механизмов гормон-рецепторного взаимодействия, и в частности для решения проблем, связанных с множественностью близких по стабильности конформеров низкомолекулярных пептидных гормонов.

В этой связи можно заметить, что большинство работ по исследованию структурно-функциональной организации молекулы ангиотензина на основе анализа данных о биологической активности аналогов молекулы (число которых превышает 200),

по существу, никак не использует сведения о возможной пространственной структуре ангиотензина; таким образом, полученные в этих работах выводы можно, в принципе, существенно дополнить, обратившись к предложенной в главе 1 модели пространственной организации молекулы ангиотензина, независимой от данных биологического тестирования аналогов. Далее с этой точки зрения будут обсуждаться результаты биологического тестирования полных или частичных агонистов ангиотензина.

Следует еще раз подчеркнуть, что, поскольку известны лишь единичные случаи использования меченых препаратов аналогов ангиотензина в экспериментах по непосредственному изучению гормон-рецепторного взаимодействия (результаты этих исследований обсуждались в предыдущей главе), анализ, приведенный ниже, может быть ориентирован лишь на получение сугубо качественных оценок. Систематическая и вполне корректная интерпретация данных подобного рода невозможна даже на основе параметров уравнения (2.2.10) — основе, отнюдь не безупречной, как отмечалось выше. Правда, получение характеристик pD_2 и α стало в последние годы рутинной процедурой, используемой при испытании большей части вновь синтезируемых аналогов ангиотензина. Тем не менее отдельные оценки этих величин известны далеко не для всех аналогов; значительную неопределенность при сопоставлении результатов отдельных испытаний вносят также методические различия, прежде всего использование тестовых объектов разного происхождения.

3.1. ФАКТОРЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНАЛОГОВ ПРИРОДНОГО ГОРМОНА

Факторы, определяющие биологическую активность аналогов гормона, можно условно разделить на три группы. Во-первых, модификация валентной структуры может затронуть боковые цепи или отдельные функциональные группы, отвечающие непосредственно за генерирование вторичного сигнала, т. е. повлиять на величину внутренней активности α . Далее, включение в состав молекулы остатка с «необычным» валентным строением или конфигурацией влияет на устойчивость молекулы гормона в отношении ферментативного расщепления, что особенно сказывается на биологической реакции в экспериментах

in vivo. И, наконец, возможны аминокислотные замены, в той или иной мере нарушающие конформационную подвижность молекулы, что сказывается прежде всего на величине сродства гормона к рецептору, характеризуемого в первом приближении показателем pD_2 . Такое представление характерно для любой из существующих в настоящее время моделей процесса гормонального взаимодействия, будь то модель «ключ—замок» [93], построенная по аналогии с моделями фермент-субстратного взаимодействия, или модель «застежки-молнии» («zipper») [93], по которой отбор «нужных рецептору» конформеров молекулы гормона происходит после первичного контакта гормона и рецептора, или модель, предполагающая динамически-индуцированное соответствие пространственных структур гормона и рецептора [50], т. е. изменение в процессе взаимодействия пространственной структуры как гормона, так и рецептора.

Ясно, однако, что более или менее четкое разделение типов аминокислотных замен в молекуле гормона на «функциональные», «противодеградационные» и «конформационные» невозможно, если использовать для этого лишь результаты стандартного тестирования биологической активности аналогов. Замена функционально важного остатка, вызывающая понижение величины α , в силу нелинейности функции $p(z)$ (см. раздел 2.2) приводит, как правило, и к перемещению КККЭ в полулогарифмических координатах в сторону высоких концентраций, т. е. к снижению величины pD_2 , которое в этом случае может не означать изменения характера конформационной подвижности молекулы. С другой стороны, например, изменение конфигурации N-концевого остатка Asp^1 должно, вообще говоря, изменить конформационные возможности молекулы и снизить величину сродства к рецепторам, но в то же время такая замена придает молекуле устойчивость по отношению к аминоклепептидазам, что может проявиться в увеличении прессорной реакции [270]. Наконец, возможны случаи, когда замена затрагивает остатки, существенные как с точки зрения генерирования вторичного сигнала, так и для определения пространственной структуры молекулы гормона. Нельзя забывать также, что связывание гормона с рецептором, характеризуемое величиной pD_2 , может зависеть не только от конформационных возможностей молекулы гормона, но и от наличия в ее составе некоторых функциональных групп, взаимодействующих с соответствующими структурными элементами рецептора.

Структурные аспекты активности аналогов ангиотензина

Таким образом, задача определения роли того или иного остатка молекулы гормона в гормон-рецепторном взаимодействии является весьма сложной и далеко не однозначной. Тем не менее, располагая достаточно полными сведениями о конформационной подвижности молекулы, можно попытаться приблизиться к решению этой задачи с помощью анализа чисто «конформационных» факторов, влияющих на биологическую активность аналога посредством снижения значения pD_2 при сохранении величины α . Для этого прежде всего необходимо выяснить, какие именно элементы молекулы ответственны за генерирование вторичного сигнала.

Подобные исследования были проведены с помощью тестирования миотропной реакции аналогов ангиотензина, полученных замещением каждого из остатков молекулы на аланин [262]. Тестирование осуществлялось на двух препаратах гладкой мускулатуры: полоске аорты кролика и полоске желудка крысы. Результаты исследования приведены в табл. 3.1 и на рис. 3.1, которые показывают, что остатками, принимающими участие в генерировании вторичного сигнала, вероятнее всего, являются Phe⁸, Tyr⁴ и, в меньшей степени, His⁶. Следует отметить, что замена этих остатков на аланин не нарушает локальных стерических условий и не должна вызывать резких изменений конформационной подвижности молекулы ангиотензина. Таким образом, изменение величины pD_2 в результате аминокислотных замен в положениях 1, 2, 3, 5 и 7 можно со значи-

Таблица 3.1

Миотропная активность аналогов ангиотензина, полученных заменой аминокислотных остатков на аланин [262]

Аналог	Параметры миотропной реакции			
	Аорта кролика		Желудок крысы	
	α	pD_2	α	pD_2
АТ	1,0	8,86	1,0	7,75
[Ala ¹]-АТ	1,0	7,78	1,0	7,66
[Ala ²]-АТ	1,0	5,90	1,0	5,85
[Ala ³]-АТ	1,0	7,73	1,0	7,33
[Ala ⁴]-АТ	0,8—0,9	4,14	—	—
[Ala ⁵]-АТ	1,0	6,42	1,0	5,50
[Ala ⁶]-АТ	1,0	6,10	0,8	5,50
[Ala ⁷]-АТ	0,93	6,73	1,0	5,83

тельной степенью уверенности отнести на счет конформационных перестроек молекулы гормона.

К сожалению, для большинства аналогов ангиотензина, описанных в литературе, известна лишь недифференцированная оценка их биологического эффекта — прессорная активность, а отдельные оценки величин α и pD_2 отсутствуют. В этом случае, разумеется, отнесение эффекта на счет того или иного структурного изменения может быть существенно менее однозначным. Очевидно также, что столь сложный физиологический сдвиг, как изменение давления крови, определяется реакцией многих органов и тканей, так что использование данных о прессорной активности аналогов в сопоставлении с величинами α и pD_2 требует известной осторожности.

С другой стороны, на примере тех аналогов, для которых помимо прессорной активности известны также оценки α и pD_2 (табл. 3.2), можно убедиться, что в подавляющем большинстве случаев основным фактором, определяющим падение прессорной активности, является именно снижение сродства к рецептору. В первом приближении прессорную реакцию можно представить как линейную комбинацию реакций нескольких ангиотензинчувствительных центров:

$$\Delta P = \sum_i \frac{B_i \alpha_i C}{ED_{50}^i + C}, \quad (3.1.1)$$

учитываемых с весовыми коэффициентами B_i .

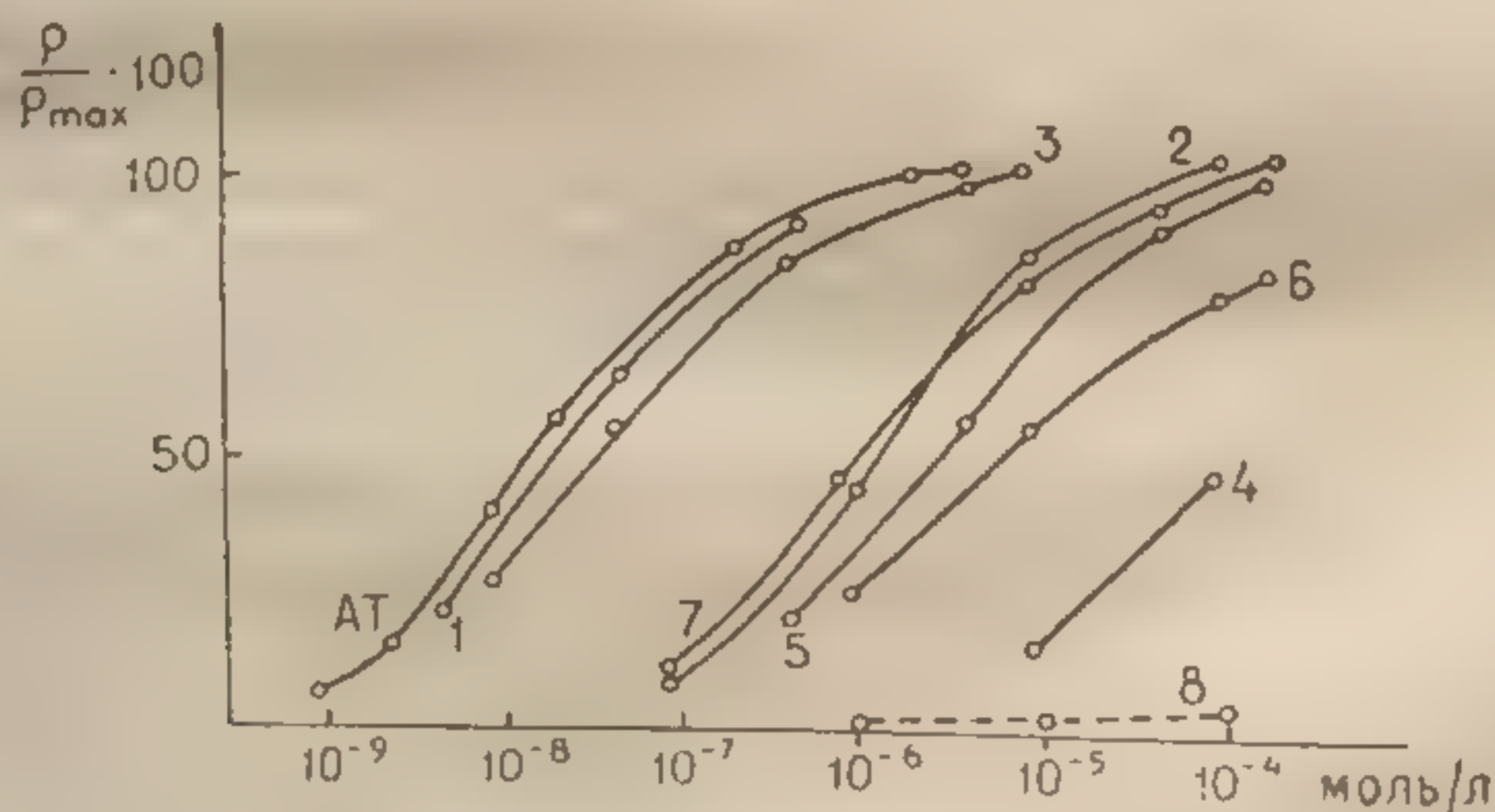


Рис. 3.1. Кумулятивные кривые «концентрация—эффект» (КККЭ) для аналогов ангиотензина с заменами различных аминокислотных остатков на аланин; тестирование на полоске желудка крысы [262]. Нумерация кривых соответствует номерам остатков в аминокислотной последовательности ангиотензина, которые заменены на аланин.

Структурные аспекты активности аналогов ангиотензина

В случае модификации, не затрагивающей значений α_i , изменение величины отношения концентраций стандартного препарата $C_{ст}$ и испытуемого соединения C_i , вызывающих равный прессорный эффект, всегда будет приблизительно пропорциональным изменениям ED_{50}^i : если значения ED_{50}^i близки, — это очевидно, если одна из этих величин существенно меньше остальных, — изменения ΔP будут определяться практически

Таблица 3.2

Аналоги, обладающие полной внутренней активностью ($\alpha=1$), для которых исследованы миотропная и прессорная реакции

Аналог	Прессорная реакция* ($V=2-\lg P$)	Миотропная реакция ($\Delta pD_2 = pD_{2,ст} - pD_2$)		Литературный источник
		Аорта кролика	Желудок крысы	
AT	0,0	0,0	0,0	
[Bet ¹]-AT	1,00	1,46	0,85	[275]
[Me ₂ But ¹]-AT	1,60	—	1,34	[262]
[β -Asp ¹]-AT	-0,04	0,52	-0,21	[273]
[β -D-Asp ¹]-AT	-0,24	0,06	-0,51	[275]
[Pyr ¹]-AT	-0,10	0,65	0,37	[262, 275]
[D-Ala ¹]-AT	0,0	-0,33	-0,28	[262, 275]
[Suc ¹]-AT	0,16	0,93	0,33	[77]
[Ala ¹]-AT	0,43	1,08	0,09	[262]
[Pro ¹]-AT	0,23	0,69	0,45	[275]
[poly-L,D-Ala-Asp ¹]-AT	0,30	0,96	-0,05	[275]
[Sar ¹]-AT	0,07	-0,24	-0,46	[273]
[Me ₂ Gly ¹]-AT	-0,4	0,52	0,11	[262]
[Aspc ¹]-AT	0,16	—	0,0	[259]
[Ala ²]-AT	1,11	2,96	1,90	[262]
[Pro ²]-AT	1,89	—	2,11	[262]
[D-Abu ²]-AT	2,05	—	2,28	[262]
[Aspc ²]-AT	4,16	—	2,20	[259]
[Ala ³]-AT	0,13	1,13	0,42	[262]
[Aspc ³]-AT	1,40	—	1,20	[259]
[Ala ⁵]-AT	1,26	2,44	2,25	[262]
[Aspc ⁵]-AT	0,0	—	1,90	[259]
[Ala ⁷]-AT	1,96	2,13	1,92	[262]
[Aspc ⁷]-AT	1,92	—	2,30	[259]

* Величина V представляет собой среднее от сообщаемых для данного аналога ■ различных экспериментах (литературные ссылки см. ■ тексте).

только вкладом соответствующего члена. Если же модификация вызывает, помимо этого, изменения величин α_i отдельных рецепторов (вообще говоря, уже не пропорциональные), изменение реакции ΔP не будет столь однозначным.

Тем самым можно предположить, что в случае сохранения величины $\alpha=1$ должна наблюдаться хорошо выраженная корреляция между величиной

$$V_i = \lg \frac{C_{ст}}{C_i} \quad (3.2.1)$$

и величинами $\Delta pD_2^i = pD_2^{ст} - pD_2^i$ для соответствующих аналогов ангиотензина (см. табл. 3.2). (Отметим, что величина V_i вводится аналогично величине ΔpD_2^i : $V_i = 2 - \lg P_i$, где P_i — прессорная активность аналога в процентах от стандартной реакции, т. е. величина V для стандарта равна нулю, а ее увеличение соответствует падению прессорной реакции.) Действительно, расчет коэффициента корреляции величин V_i и ΔpD_2^i для двух типов мышц — полоски аорты кролика и полоски желудка крысы дает значения 0,83 и 0,91 соответственно.

Таким образом, в случае аналогов ангиотензина, обладающих полной внутренней активностью ($\alpha=1$), в принципе допустимо использование показателя прессорной активности V в качестве приближенной меры изменения pD_2 ; иными словами, этот подход может быть использован в отношении тех аналогов, которые получены модификацией остатков, не принимающих участия в генерировании вторичного сигнала, т. е. остатков в положениях 1, 2, 3, 5 и 7.

3.2. АНАЛОГИ АНГИОТЕНЗИНА С МОДИФИКАЦИЕЙ В ПОЛОЖЕНИИ 1

К настоящему времени в литературе описаны результаты биологического тестирования примерно 30 аналогов $[\text{Val}^5]$ - и $[\text{Ile}^5]$ -ангиотензинов с модификациями положения 1. Для многих из этих соединений исследована не только прессорная, но и миотропная реакция (см. табл. 3.2).

Характерно, что практически все аналоги этой группы сохраняют сравнительно высокую активность; некоторое исключение составляют лишь аналоги $[\text{Bet}^1]$ -АТ, для которого величина

ΔpD_2 равна 1,46 и 0,85 (аорта кролика и желудок крысы) и $V=1,0$, а также $[\text{Me}_2\text{But}^1]\text{-AT}$ — $\Delta pD_2=1,34$ (желудок крысы) и $V=1,6$ (см. табл. 3.2). Таким образом, модификация молекулы в положении 1, по-видимому, не приводит к существенному снижению сродства к рецептору.

Этот факт, в свою очередь, может быть интерпретирован как указание на то, что модификация положения 1 мало влияет на конформационные возможности молекулы в целом. В самом деле, замена остатка Asp^1 (или Asn^1) на остатки с существенно иными стерическими условиями приводит к получению аналогов с высокой активностью: $[\text{D-Asp}^1]\text{-AT}$ ($V=0,0 \div 0,18$ [175, 270, 283]), $[\text{D-Asn}^1]\text{-AT}$ ($V=0,04 \div 0,0$ [276, 283]), $[\beta\text{-Asp}^1]\text{-AT}$ ($V=0,10 \div -0,18$ [38, 76, 208, 266, 270, 273, 275]), $[\beta\text{-D-Asp}^1]\text{-AT}$ ($V=-0,18 \div -0,30$ [270, 275]), $[\text{Pyr}^1]\text{-AT}$ ($V=0,0 \div -0,18$ [108, 283]), $[\text{Gly}^1]\text{-AT}$ ($V=0,44 \div 0,30$ [170, 302]), $[\text{D-Ala}^1]\text{-AT}$ ($V=0,0$ [275, 308]), $[\text{петро-Gly}^1\text{-CO}]\text{-AT}$ ($V=-0,11$ [5]). Характерные для некоторых аналогов отрицательные значения V объясняются также упоминавшимся ранее фактором — защитой наиболее уязвимой в молекуле ангиотензина N-концевой пептидной связи от ферментативного расщепления.

Характер бокового радикала в положении 1 не является, по-видимому, существенным для проявления специфической биологической активности, хотя можно отметить, что более низкие значения V наблюдаются у аналогов, содержащих в положении 1 карбоксил или карбоксамид; в число аналогов помимо перечисленных выше входят $[\text{Suc}^1]\text{-AT}$ ($V=0,30 \div 0,0$ [77, 79]), $[\text{Glu}^1]\text{-AT}$ ($V=-0,70$ [108, 283]), $[\text{Gln}^1]\text{-AT}$ ($V=0,0$ [283]) и $[\gamma\text{-Glu}^1]\text{-AT}$ ($V=0,0$ [108]). Другие замены приводят к некоторому повышению значения V : $[\text{Arg}^1]\text{-AT}$ ($V=0,48$ [231, 314]), $[\text{Ile}^1]\text{-AT}$ ($V=0,60$ [307]), $[\text{Ala}^1]\text{-AT}$ ($V=0,43$ [262]), $[\text{Pro}^1]\text{-AT}$ ($V=0,23$ [308]) и $[\text{des-Asp}^1]\text{-AT}$ ($V=0,70 \div 0,30$ [69, 77, 170, 232, 243, 269, 286, 302, 304, 314]). Исключение в этом ряду представляет, как уже упоминалось, аналог $[\text{Bet}^1]\text{-AT}$ ($V=1,00$ [275, 308]), у которого можно было бы ожидать проявления повышенной устойчивости к ферментативному расщеплению.

Для проявления биологической активности не является необходимой и α -аминогруппа молекулы: аналоги $[\text{Ac-Asn}^1]\text{-AT}$ ($V=0,46 \div 0,30$ [172]), $[\text{Bz}(\text{NO}_2)\text{-Asn}^1]\text{-AT}$ ($V=0,40 \div 0,30$ [122]), $[\text{Bz}(\text{NH}_2)\text{-Asn}^1]\text{-AT}$ ($V=0,40 \div 0,30$ [122]) и даже $[\text{poly-Ser-Ac-Asp}^1]\text{-AT}$ ($V=0,40$ [79]) и $[\text{poly-L, D-Ala-Asp}^1]\text{-AT}$ ($V=0,30$ [275]) характеризуются незначительным повышением

величины V , а аналоги, в которых блокирование α -аминогруппы сопряжено с повышением устойчивости к расщеплению, обладают еще большим прессорным эффектом: $[\text{Sar}^1]\text{-AT}$ ($V = 0,16 \div 0,0$ [260, 273, 308]) и $[\text{Me}_2\text{Gly}^1]\text{-AT}$ ($V = 0,06 \div -0,86$ [58, 275, 308]).

Таким образом, анализ влияния модификаций положения 1 на биологическую активность аналогов гормона приводит к заключению, что остаток в этом положении не влияет существенно образом на формирование пространственной структуры молекулы. Можно заметить, что именно такой вывод следует из данных расчета стабильных пространственных структур ангиотензина, изложенных в главе 1. В то же время модификации положения 1 весьма важны с точки зрения повышения устойчивости молекулы к расщеплению аминопептидазами.

3.3. АНАЛОГИ АНГИОТЕНЗИНА С МОДИФИКАЦИЕЙ В ПОЛОЖЕНИИ 2. КВАЗИЦИКЛИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЫ АНГИОТЕНЗИНА КАК ФАКТОР СРОДСТВА К РЕЦЕПТОРУ

Наиболее распространенное в настоящее время объяснение роли остатка Arg^2 молекулы ангиотензина в процессе связывания гормона с рецептором основано на предположении, что положительно заряженная гуанидиновая группа боковой цепи аргинина взаимодействует непосредственно с ионогенными группами рецептора, стабилизируя гормон-рецепторный комплекс (например, [262]); в то же время участие остатка Arg^2 в структурообразовании молекулы гормона, как это предполагается моделью пространственной структуры ангиотензина, предложенной в главе 1, полностью игнорируется. Можно, однако, показать, что привлечение к рассмотрению гипотезы о квазициклизации структуры молекулы ангиотензина с образованием внутримолекулярной связи ионного типа $\text{Arg}^2\text{-(NH-C-(NH}_2)_2)^+ \dots -\text{OOC-Phe}^8$ (см. гл. 1) дает возможность более полного истолкования совокупности данных о биологической активности аналогов с модификацией в положении 2.

Наличие положительного заряда боковой цепи в положении 2 является важным фактором биологической активности; это доказывается как низкими значениями V для аналогов, обла-

дающих таким зарядом: [Orn²]-AT ($V=0,70$ [268, 286]), [Lys²]-AT ($V=1,00$ [281]), так и резким увеличением этой величины для аналогов с нейтральными боковыми цепями: [Cit²]-AT ($V=1,77$ [276]), [Val²]-AT ($V=1,30$ [281]), [Gly²]-AT ($V=1,52 \div 1,0$ [30, 32, 187]), [Ala²]-AT ($V=1,11$ [262]), [Pro²]-AT ($V=1,89$ [308]), [D-Abu²]-AT ($V=2,05$ [262]). Поскольку, как показано выше, характер аминокислотного остатка в положении 1 мало влияет на величину V , к числу аналогов, падение пресорной активности которых обусловлено элиминацией боковой цепи аргинина, можно добавить также [Suc¹, Gly²]-AT ($V=2,0$ [187]), [Sun¹, Gly²]-AT ($V=1,97$ [187]), [Hyd¹, Gly²]-AT ($V=1,98$ [30]), [Pr¹, Gly²]-AT ($V=1,99$ [30]). Та же закономерность в общих чертах сохраняется и для аналогов [*des*-Asp¹]-AT, большое количество которых рассматривается, например, в [69]. Тем не менее существуют аналоги, лишенные положительного заряда боковой цепи остатка, находящегося в положении 2, и в то же время обладающие сравнительно низкими значениями V : [Arg(NO₂)²]-AT ($V=0,30$ [170, 267, 286]), [Gly¹, Gly²]-AT ($V=0,82 \div 0,70$ [31, 66]), а также некоторые аналоги [*des*-Asp¹]-AT [69].

Здесь важно отметить еще раз то обстоятельство, что, согласно расчетным оценкам, внутримолекулярное взаимодействие ионного типа является важным, но не решающим фактором реализации квазициклических структур молекулы. Как было показано в разделе 1.2, полная нейтрализация одной из ионогенных групп не вызывает существенных перестроек в иерархии стабильностей структур молекулы, хотя конформационная подвижность пептидного остова при этом значительно повышается. Следует ожидать, что частичная деионизация указанных групп или повышение диэлектрической проницаемости среды, возможные при взаимодействии молекулы с рецептором, также приводят к некоторому увеличению ее конформационной подвижности, облегчая тем самым конформационные превращения, вероятные на различных этапах этого взаимодействия.

Высокая активность аналога [Arg(NO₂)²]-AT может быть, таким образом, объяснена сохранением в этом случае присутствием нативной молекуле системы внутримолекулярных невалентных взаимодействий с участием атомов бокового радикала остатка Arg(NO₂). В случае же аналога [Gly¹, Gly²]-AT можно предположить, что конформационно гибкий фрагмент Gly-Gly, несущий заряженную α -аминогруппу, вовлекаясь в связь ион-

ного типа с С-концевым карбоксилем, способен «заменить» боковую цепь аргинина, что стабилизирует квазициклические структуры, характерные для природного гормона. Эта гипотеза была проверена конформационным анализом молекулы аналога. Схема расчета выглядела следующим образом: вначале, по результатам расчета С-концевого гексапептида, были отобраны лишь те его конформации (различающиеся типом структуры пептидного остова), которые превосходили по конформационной энергии наиболее стабильную менее чем на 15 ккал/моль. Конформационная подвижность полной молекулы исследовалась на примере модельного фрагмента: $\text{NH}_3^+\text{-Gly-Gly-Val-Ala-Val-Ala-Pro-Ala-COO}^-$.

Расчет модельного фрагмента показал, что наиболее стабильные его конформации относятся к числу квазициклических структур. Для дальнейшего расчета было отобрано 20 конформаций, энергия которых превосходит энергию наиболее стабильной конформации фрагмента не более чем на 10 ккал/моль.

Указанные конформации рассматривались на уровне полной молекулы аналога $[\text{Gly}^1, \text{Gly}^2]\text{-AT}$, причем по результатам расчета С-концевого гексапептида выбирались наиболее стабильные для данного типа структуры пептидного остова конформации боковых цепей. Следует отметить, что с введением в рассмотрение боковых цепей иерархия стабильности конформаций остова молекулы в значительной степени дифференцируется: конформационной энергией ниже 10 ккал/моль характеризуется лишь 9 типов конформаций остова полной молекулы аналога $[\text{Gly}^1, \text{Gly}^2]\text{-AT}$, перечисленных в табл. 3.3.

При сопоставлении полученных результатов с данными о стабильных конформациях природного гормона следует учитывать, что фрагмент Gly-Gly рассматривается как своеобразный «заменитель» боковой цепи остатка Arg^2 или, иными словами, сопоставлению подлежат лишь структуры пептидного остова С-концевого гексапептида.

Далее можно отметить, что структуры 2 и 6, приведенные в табл. 3.3, различаются лишь поворотом на 180° плоскости пептидной группы между вторым и третьим остатками и, следовательно, с точки зрения общих пространственных очертаний молекулы, представляют собой один тип структуры. И, наконец, важно учесть, что сравниваться должны оба набора в целом, поскольку разница в энергиях в 5—6 ккал/моль между отдельными конформациями легко может быть компенсирована, на-

№	Структура
1	В
2	В
3	В
4	В
5	В
6	В
7	В
8	В
9	В

пример, некото
действия межд

С учетом с
ние структур
со структурам
конформаций
структур, допу
шая конфор
мацией R ос
чета, лучшей
AT соответст
можно сделат
будущий весьма
кулой природ
формации, мож
виться на не
вия, требую
молекулы го
характерных
сравнительно
аналог (Ас-С
Еще один
ставлений я
логов, содер

Таблица 3.3

Наиболее стабильные конформации пептидного остова
аналога [Gly¹, Gly²]-АТ

№	Конформация остова								ΔU , ккал/моль
	Gly	Gly	Val	Tyr	Val	His	Pro	Phe	
1	B	R	B	R	R	B	B	B	0,0
2	B	B	B	R	R	B	B	B	0,4
3	B	L	B	R	R	B	B	B	1,6
4	B	B	B	B	R	B	R	B	6,1
5	B	H	B	B	R	B	B	B	7,0
6	B	R	L	R	R	B	B	B	7,4
7	B	R	B	B	R	B	B	B	7,9
8	B	H	B	R	R	B	B	B	9,1
9	B	L	B	B	R	B	R	B	9,9

пример, некоторым ослаблением электростатического взаимодействия между концевыми группами молекул.

С учетом сказанного можно констатировать полное совпадение структур аналога [Gly¹, Gly²]-АТ, описанных в табл. 3.3, со структурами, содержащимися в наборе наиболее стабильных конформаций природного гормона. В то же время одна из структур, допустимых для природного гормона, характеризующаяся конформацией RR остова фрагмента Tyr-Val и конформацией R остатка Pro⁷, отсутствует в таблице; по данным расчета, лучшей конформации такого типа аналога [Gly¹, Gly²]-АТ соответствует энергия 11,5 ккал/моль. Таким образом, можно сделать вывод, что молекула аналога [Gly¹, Gly²]-АТ, будучи весьма сходной по пространственной структуре с молекулой природного гормона, несколько более ограничена в конформационной подвижности, что, вообще говоря, может проявиться на некоторых этапах гормон-рецепторного взаимодействия, требующих существенных конформационных перестроек молекулы гормона. Тем не менее ясно, что именно сохранение характерных квазициклических структур является причиной сравнительно высокой активности этого аналога (отметим, что аналог [Ac-Gly¹, Gly²]-АТ полностью неактивен [66]).

Еще одним аргументом в пользу развиваемой системы представлений является существенное повышение величины V аналогов, содержащих в положении 2 D-изомер аргинина: [D-Arg²]-

АТ ($V=1,40$ [302]), [D-Asn¹, D-Arg²]-АТ ($V=1,37$ [276]), [pemp-
po-Gly¹-CO-D-Arg²]-АТ ($V=1,47$ [5]) и [Et-O-pemp-
po-Gly¹-CO-D-Arg²]-АТ ($V=1,82$ [3]). Локальные стерические условия
D-изомеров аминокислот существенно иные, чем L-изомеров
(подробнее см. раздел 3.6), и, следовательно, в результате по-
добной замены могут возникнуть напряжения, приводящие к де-
стабилизации характерных квазициклических структур молекулы.
Следует отметить, что повышение величины V приведенных ана-
логов может быть связано и с выраженной стереоспецифич-
ностью гипотетических контактов гуанидиновой группы остатка
Arg² с ионогенными группами рецепторов. Однако в этом слу-
чае следовало бы ожидать также повышения величины V ана-
логов [des-Asp¹]-АТ, полученных заменой N-концевой амино-
кислоты на ее D-изомер, в то время как в действительности
зачастую наблюдается обратное явление [186].

Объяснение этого интересного эффекта обычно базируется
на предположении о повышенной устойчивости к аминопепти-
дазам аналогов [des-Asp¹]-АТ с D-аминокислотами в N-конце-
вом положении [262]. Можно утверждать, однако, что на сни-
жение величин V этих аналогов влияют также чисто «конфор-
мационные» факторы. Последствия изменения стерических ус-

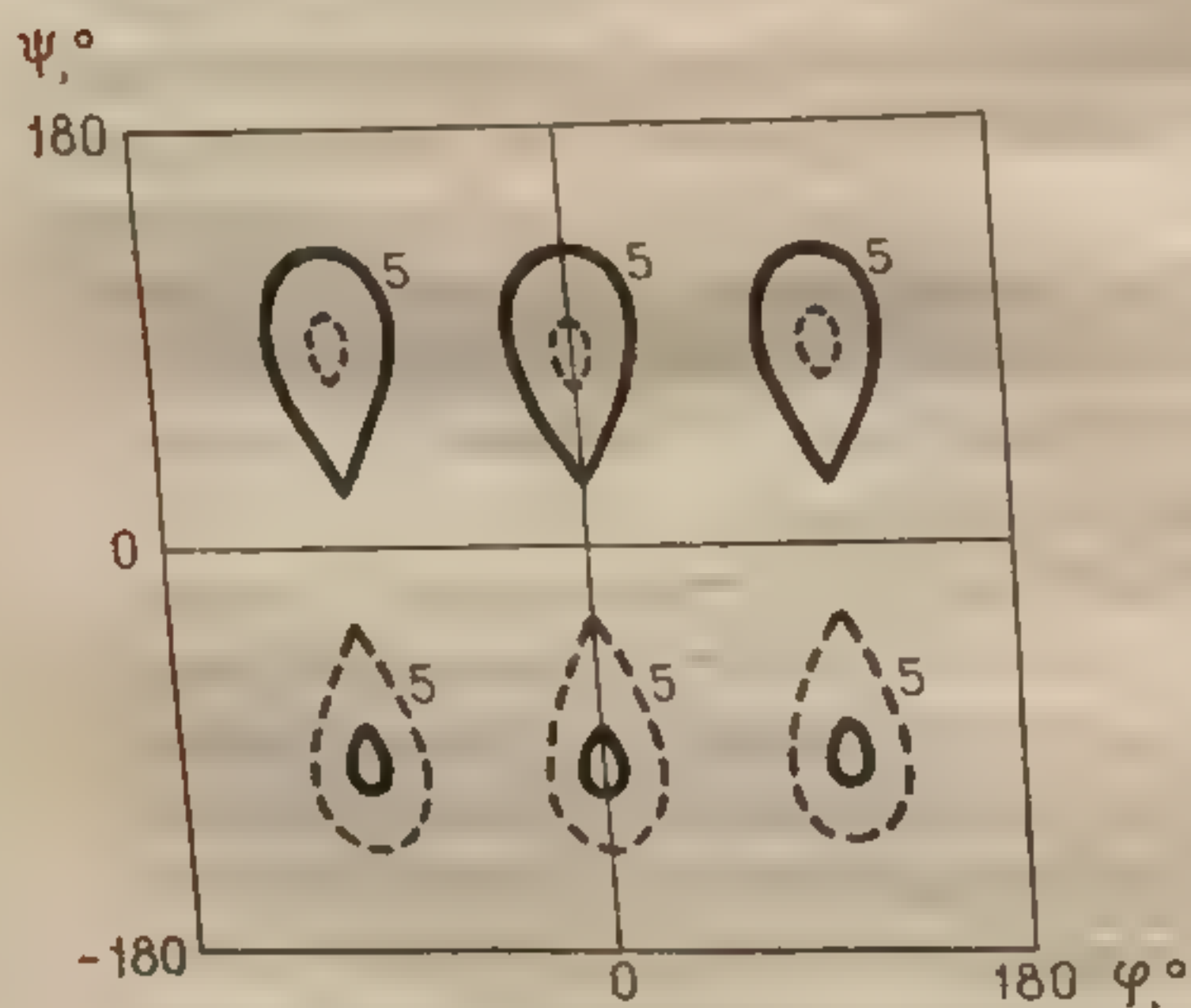


Рис. 3.2. Потенциальные карты аминокислотного остатка L- (сплошная линия) и D-конфигурации (пунктир), находящегося в N-концевом положении пептидной цепи со свободной α -аминогруппой.

ловий при замене N-концевой аминокислоты на ее D-изомер иллюстрируются конформационной картой рис. 3.2: для L-аминокислоты стерически «разрешенными» оказываются районы конформаций остова типа В и L, а для D-аминокислоты — типа R и H. В то же время данные расчета гептапептида [des-Asp¹]-АТ (АТ 2—8), приведенные в табл. 1.3, свидетельствуют о том, что наиболее стабильными его структурами ($\Delta U \sim 5$ ккал/моль) являются структуры с конформацией остова остатка Arg² типа R, причем самая стабильная структура — RBRRBBB — остается в числе стабильных

структур молекулы и после добавления остатка Asp¹. Иными словами, в случае гептапептида со свободной α -аминогруппой (но не октапептида!) замена остатка Arg² на D-изомер приводит к дальнейшей стабилизации характерных квазициклических структур, что отражается в повышении сродства полученных аналогов к рецептору. Учитывая, что упомянутые характерные структуры оказываются достаточно стабильными уже на уровне С-концевого гексапептида (см. табл. 1.2), можно ожидать, что аналогичные соображения окажутся справедливыми и в отношении аналогов [*des*-Asp¹]-АТ, содержащих в N-концевом положении D-стереоизомеры α -алкильных остатков: Ala, Abu, Nva, Leu [69]. Однако сравнительно низкие значения V для аналогов [*des*-Asp¹, D-Ala²]-АТ ($V=0,32$), [*des*-Asp¹, D-Abu²]-АТ ($V=0,64$ [69]) и [*des*-Asp¹, D-Nva²]-АТ ($V=0,89$ [69]) вряд ли удастся объяснить только структурными факторами.

На факт квазициклизации стабильных пространственных структур молекулы ангиотензина, поддерживаемой внутримолекулярной связью ионного типа, указывают также данные об активности аналогов, полученных модификацией остатка, несущего вторую ионогенную группу, участвующую в этой связи, — Phe⁸. Модификация боковой цепи остатка Phe⁸ сильно сказывается на значении параметра α (см. раздел 3.5); здесь, однако, будут рассмотрены лишь аналоги с немодифицированной боковой цепью. Прежде всего это [Phe⁸-NH₂]-АТ ($V=2,00 \div 1,52$ [170, 267, 286]) и [D-Asp¹, Phe⁸-NH₂]-АТ ($V=2,52$ [175]), инактивация которых может быть приписана именно нейтрализации С-концевого карбоксила. Более низкие значения V характерны для аналогов [Phe⁸-O-Me]-АТ ($V=1,00 \div 0,44$ [273, 286, 305]), [Phe⁸-O-Et]-АТ ($V=0,50$ [273]) и [Phe⁸-poly-Lys]-АТ ($V=1,0 \div 0,52$ [172]); в этих случаях, по-видимому, следует считаться еще и с повышенной устойчивостью аналогов по отношению к карбоксипептидазам [273]. Наконец, очень велико падение активности у аналога [D-Phe⁸]-АТ ($V=3,0$ [156, 259, 274]). Следует учесть, что, занимая в аминокислотной последовательности молекулы ангиотензина С-концевое положение, остаток Phe⁸ ограничен во вращении вокруг связи N—C α относительно остальной части молекулы лишь взаимодействием с ней его боковой цепи и С-концевого карбоксила. В случае [D-Phe⁸]-АТ боковая цепь Phe⁸ могла бы, в принципе, занять то же положение относительно остальной части молекулы, что и в немодифицированной молекуле ангиотензина, с незначительным проигры-

шем конформационной энергии; однако это требует существенно иной ориентации карбоксила, участвующего в сильном внутримолекулярном взаимодействии. Следовательно, резкое понижение активности у этого аналога также может быть истолковано в пользу существования квазициклической структуры молекулы, замкнутой связью ионного типа и являющейся важным фактором сродства к рецептору.

3.4. АНАЛОГИ АНГИОТЕНЗИНА С МОДИФИКАЦИЯМИ В ПОЛОЖЕНИЯХ 3, 5 И 7

Модификация молекулы ангиотензина в положениях 3, 5 и 7 не приводит, как отмечалось выше, к понижению величины α ; с другой стороны, инертные боковые цепи остатков Val³, Val/Ile⁵ и Pro⁷ вряд ли вступают в непосредственное взаимодействие со специфическими функциональными группами на поверхности рецептора. Можно ожидать поэтому, что изменения величины сродства к рецептору у аналогов с заменами в этих положениях окажутся связанными в первую очередь с изменениями локальных стерических условий, а также с изменением таких физико-химических характеристик замещаемых остатков, как гидрофобность, объем и т. п.

В справедливости этого предположения легко убедиться на примере аналогов с замещениями в положении 3: аналоги, в которых локальные стерические условия третьего остатка совпадают с таковыми для остатка Val³, отличаются сравнительно низкими значениями V : [Leu³]-AT ($V=0,0$ [286]), [Ala³]-AT ($V=0,17-0,10$ [195, 262]), [Tyr³]-AT ($V=0,92$ [284]). Отметим, что в последнем случае даже существенное изменение химической природы боковой цепи не очень сильно повлияло на величину V . К этой же группе аналогов следует, по-видимому, отнести и [Pro³]-AT ($V=0,52-0,23$ [4, 262, 294, 307]); влияние этой замены на конформацию предыдущего остатка подробно обсуждается в разделе 3.6. В то же время для аналогов с измененными стерическими условиями в положении 3 характерна резкая потеря активности: [Gly³]-AT ($V=2,30$ [3]), [Aib³]-AT ($V=2,0$ [207]), [Gly¹, Gly², Gly³]-AT ($V=2,52-3,0$ [31, 186]), [Asp³]-AT ($V=1,40$ [259]).

Аналогичный вывод может быть сделан и в отношении за-

Структура
мен в положении
ния в характер
сохраняющими
[Hyp⁷]-AT ($V=$
Все остальные за
ной утрате актив
[Pip⁷]-AT ($V=2,7$
[Gly⁷]-AT ($V=4,3$
Несколько по-
ложении 5: здесь
нения локальных
цепи. Действитель
руемые полярные
аналогов [His⁵]-A
тем не менее ана
($V=1,0$ [188]) с
вводящие в этом
дважды β -замеще
кую активность:
($V=0,05$ [67, 188]
($V=0,0$ [67, 188]
логов, содержащ
боковой цепью, а
боковой цепи: [L
[68]), [Nle⁵]-AT
[Pro⁵]-AT ($V=$
262, 307)). В эт
чить также ана
молекулы — [A
номерностей рас
нести эффект пад
стерических усло
[68]) и [Sar⁵]-A
нение причин ут
аналога [D-Pro⁵
В заключении
биологической а
в положении 5 д
ных стерических
странным предло
сацией структур

мен в положении 7. В самом деле, сравнительно низкие значения V характерны лишь для аналогов, полученных заменами, сохраняющими локальные стерические условия остатка Pro^7 : $[\text{Hyp}^7]\text{-AT}$ ($V=1,01$ [291]) и $[\text{N-Me-Ala}^7]\text{-AT}$ ($V=0,80$ [64]). Все остальные замены в этом положении приводят к почти полной утрате активности: $[\text{Ala}^7]\text{-AT}$ ($V=2,08-1,82$ [262, 287]), $[\text{Pip}^7]\text{-AT}$ ($V=2,70-2,0$ [60]), $[\text{Aspc}^7]\text{-AT}$ ($V=1,92$ [259]) и $[\text{Gly}^7]\text{-AT}$ ($V=4,3$ [40]).

Несколько по-иному обстоит дело в отношении замен в положении 5: здесь, по-видимому, важен не только факт сохранения локальных стерических условий, но и характер боковой цепи. Действительно, замена остатка Val/Ile^5 на легко ионизируемые полярные остатки приводит к полной потере активности аналогов $[\text{His}^5]\text{-AT}$ [235], $[\text{Arg}^5]\text{-AT}$ [235] и $[\text{Tyr}^5]\text{-AT}$ [235], тем не менее аналоги $[\text{Ser}^5]\text{-AT}$ ($V=0,85$ [235]) и $[\text{Thr}^5]\text{-AT}$ ($V=1,0$ [188]) сохраняют определенную активность. Замены, вводящие в этом положении остаток, содержащий массивные дважды β -замещенные цепи, дают возможность сохранить высокую активность: $[\text{Chg}^5]\text{-AT}$ ($V=-0,15$ [67, 188]), $[\text{Cpg}^5]\text{-AT}$ ($V=0,05$ [67, 188]), $[\text{Aev}^5]\text{-AT}$ ($V=0,13$ [67, 188]), $[\alpha\text{-Ile}^5]\text{-AT}$ ($V=0,0$ [67, 188]) и $[\text{Thr-O-Me}^5]\text{-AT}$ ($V=-0,25$ [188]). У аналогов, содержащих в положении 5 остатки с алифатической боковой цепью, активность снижается по мере снижения объема боковой цепи: $[\text{Leu}^5]\text{-AT}$ ($V=0,60$ [286]), $[\text{Cpa}^5]\text{-AT}$ ($V=0,62$ [68]), $[\text{Nle}^5]\text{-AT}$ ($V=0,68$ [67]), $[\text{Abu}^5]\text{-AT}$ ($V=0,80$ [67]), $[\text{Pro}^5]\text{-AT}$ ($V=1,0$ [68, 235]), $[\text{Ala}^5]\text{-AT}$ ($V=1,52-1,13$ [67, 262, 307]). В эту группу аналогов можно, по-видимому, включить также аналог со «вставкой» фенильного кольца в остов молекулы — $[\text{Amb}^5]\text{-AT}$ ($V=0,72$ [235]). Именно из-за закономерностей рассмотренного типа невозможно однозначно отнести эффект падения активности на счет изменения локальных стерических условий в случаях аналогов $[\text{Aib}^5]\text{-AT}$ ($V=2,05$ [68]) и $[\text{Sar}^5]\text{-AT}$ ($V=2,0$ [68]). С другой стороны, такое объяснение причин утраты активности вполне правомерно в случае аналога $[\text{D-Pro}^5]\text{-AT}$ ($V=3,3$ [68]).

В заключение можно отметить, что данные тестирования биологической активности аналогов ангиотензина с заменами в положении 5 дают довольно расплывчатые сведения о локальных стерических условиях остова остатка Val/Ile^5 ; тем более странным представляется вывод работ [67, 68] о четкой фиксации структуры остова остатка Val^5 в конформации, характе-

ризуемой значениями углов внутреннего вращения $\varphi = -120 \pm 30^\circ$, $\psi = 120 \pm 30^\circ$; впрочем, это заключение сделано не на основании данных расчета конформационной энергии молекулы, а с помощью моделирования структуры отдельных остатков на молекулярных моделях.

3.5. АНАЛОГИ АНГИОТЕНЗИНА С МОДИФИКАЦИЯМИ В ПОЛОЖЕНИЯХ 4, 6 И 8

Как указывалось выше, для аналогов ангиотензина с аминокислотными заменами в положениях 4, 6 и 8 даже столь приближенное суждение о величине изменения гормон-рецепторного сродства по величине изменения V оказывается невозможным, поскольку описанные модификации обычно существенно изменяют характеристику внутренней активности (см., например, данные по соответствующим аналогам в табл. 3.1). Это обстоятельство, разумеется, ограничивает возможности интерпретации данных о величинах V аналогов ангиотензина с указанными замещениями. Так, в частности, несмотря на сравнительно большое число описанных в литературе аналогов с модификацией в положении 6, нельзя сделать определенного вывода о необходимом для проявления активности характере боковой группы (подобно тому, как это было сделано в отношении положения 5).

Самые разнообразные замены: на легко ионизируемые основные аминокислоты — [Lys⁶]-АТ ($V=3,0$ [284]), [Arg⁶]-АТ ($V=3,92$ [152, 293]), [Orn⁶]-АТ ($V=3,10-3,40$ [152]), на алифатические цепи — [Met⁶]-АТ ($V=2,89-2,64$ [152]), [Leu⁶]-АТ ($V=3,7$ [152]), [Ala⁶]-АТ ($V=2,10$ [194, 262]), [Gly⁶]-АТ ($V=3,52$ [262, 308]), [Asp⁶]-АТ ($V>4,00$ [259]), на кислые аминокислоты — [Glu⁶]-АТ (полностью неактивен [152]) или на ароматические остатки — [Phe⁶]-АТ ($V=2,0-1,29$ [152, 282]), [Tat⁶]-АТ ($V=2,0-0,72$ [152]) резко повышают величину V . К тому же результату приводят даже незначительные модификации имидазольного кольца гистидина: [3-Me-His⁶]-АТ ($V=1,30$ [223]) и [1-Me-His⁶]-АТ ($V=3,30$ [223]). В то же время аналог [Pza⁶]-АТ сохраняет сравнительно высокую активность: $V=0,31-0,10$ [63, 152, 241, 303]. Таким образом, единственной заменой, допускающей интерпретацию в структурных терминах,

в этом случае является замена гистидина на его стереоизомер — [D-His⁶]-АТ ($V=2,0-2,60$ [144]). Аналог, полученный в результате такой замены, теряет активность, скорее всего, из-за изменения локальных стерических условий положения 6, что влечет за собой перестройку пространственной организации молекулы в целом (подобные вопросы рассматриваются более подробно в следующем разделе).

Примерно так же обстоит дело с интерпретацией данных биологического тестирования аналогов с заменами в положении 4. Несмотря на то что в этом случае некоторые модификации остатка тирозина оказываются сравнительно мало влияющими на активность — [Aht⁴]-АТ ($V=0,60$ [271]), [Tyr(I)⁴]-АТ ($V=0,48$ [247]) и [Tyr(I₂)⁴]-АТ ($V=0,89$ [247]), модификация, например, гидроксильной группы почти полностью лишает соединение активности: [Tyr-O-Me⁴]-АТ ($V=2,70-2,0$ [60, 108, 284]). Почти полностью неактивны и аналоги с замещением тирозина самыми различными типами неароматических аминокислотных остатков: [Ala⁴]-АТ ($V=2,51$ [262, 288]), [Glu⁴]-АТ ($V>3,00$ [108]), [Leu⁴]-АТ ($V=2,70$ [262, 308]), [Gly⁴]-АТ ($V=4,3-3,16$ [40, 262]), [Aspc⁴]-АТ ($V=3,40$ [259]); в то же время аналог [Phe⁴]-АТ сохраняет некоторую активность: $V=1,0-0,66$ [262, 268, 286]. Изменение конфигурации остатка тирозина приводит, как и в случае остатка His⁶, к утрате активности: [D-Tyr⁴]-АТ ($V=3,60$ [300]).

Положение 8 молекулы ангиотензина является наиболее «чувствительным»; большинство модификаций бокового радикала остатка Phe⁸ сопряжено с почти полной утратой внутренней активности. Тем не менее некоторые модификации боковой цепи в этом положении, особенно замены на сходные по электронному строению ароматические остатки, не приводят к резкому повышению величины V : [Tyr⁸]-АТ ($V=1,00-0,08$ [284, 291]), [Phe-Br⁸]-АТ ($V=0,30$ [285, 286]), [Tal⁸]-АТ ($V=0,57$ [58]), [Trp⁸]-АТ ($V=0,66$ [58]). Некоторую активность сохраняют также аналоги [Cha⁸]-АТ ($V=0,70$ [309]) и [Arp⁸]-АТ ($V=1,00$ [309]). Замены иного типа, как правило, сообщают аналогам свойства антагонистов ангиотензина.

Исследованию антагонистов ангиотензина, полученных модификацией положения 8, посвящено большое количество квалифицированных обзоров (см., например, [321, 324]). Отметим, что антагонисты, которые обладают высоким значением pA_2 , получены, как правило, заменами боковой цепи остатка Phe⁸

на алифатические боковые цепи: Ile, Leu, Val, Ala, Abu, β -Ala. Возможны, однако, и иные замены: Gly, Thr, Thr-O β -Me. Большинство таких модификаций не изменяет локальных стерических условий остова в положении 8; тем не менее, значения pA_2 значительно варьируют от 9,21 в случае [Ile⁸]-AT до 6,54 в случае [Gly⁸]-AT [324] (тестирование на полоске аорты кролика). Замены, вызывающие изменение локальных стерических условий, способны понизить значение pA_2 ([β -Ala⁸]-AT, $pA_2=5,08$, [D- α -Ile⁸]-AT, $pA_2=7,32$ [324]). Следует упомянуть также, что значение pA_2 , так же как и pD_2 , повышается в случае аналогов с одновременной модификацией положения 1, что, очевидно, связано с повышением устойчивости аналогов такого типа (например, саралазин [Sar¹, Ala⁸]-AT) к ферментативному расщеплению.

3.6. ВОЗМОЖНЫЕ КОНФОРМАЦИИ ОСТОВА ОСТАТКОВ МОЛЕКУЛЫ АНГИОТЕНЗИНА (ПО ДАННЫМ БИОЛОГИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ)

В предыдущих разделах упоминался ряд аналогов ангиотензина, полученных с помощью структурных модификаций, вызывающих существенное изменение конформационной подвижности и локальных стерических условий пептидного остова молекулы. Результаты биологического тестирования таких аналогов могут быть использованы, в частности, для суждения об ограничении конформационных возможностей отдельных остатков; при этом, очевидно, необходимо располагать оценками изменения локальных стерических условий пептидного остова в результате конкретной аминокислотной замены.

Рассмотрим вкратце подобные эффекты, соответствующие наиболее часто используемым модификациям валентной структуры пептидных гормонов.

Остаток глицина отличается, как известно, наибольшей конформационной подвижностью остова, допуская реализацию всех четырех основных типов конформаций — В, R, L и H. Для всех прочих остатков L-конфигурации область H оказывается стерически запрещенной, а область L — напряженной. Еще более ограничена конформационная подвижность остатка пролина, который может принимать лишь две конформации — В или R.

Для остатков D-конфигурации допустимыми конформациями остова окажутся H, L и R (последняя — стерически напряженная), а область В окажется стерически запрещенной. Остаток D-пролина, соответственно, сможет принимать только конформации L и H. Интересный случай ограничения подвижности пептидного остова представляет собой α -метилаланин (Aib), для которого «разрешены» лишь конформации R и L.

Ограничение подвижности остова испытывают также остатки, расположенные перед пролином. Так, неглициновый остаток L-конфигурации (например, остаток His⁶ в молекуле ангиотензина) может принимать лишь два типа конформации остова — В и L, а остаток D-конфигурации — соответственно H и R. Очевидно, если предшественником пролина оказывается другой пролиновый остаток L-конфигурации, для него существует единственно возможный тип конформации — В; для остатка D-Pro, предшествующего пролину, возможна лишь конформация типа H. Совершенно аналогичные ограничения возможных конформаций остова предыдущего остатка вызывает включение в пептидную цепь остатков N-метиламинокислот [319].

Если соответствующая некоторому аналогу химическая модификация структуры сопровождается изменениями стерических условий остова в описанном выше смысле, то по ее влиянию на биологическую активность молекулы можно судить о необходимых для проявления этой активности конформациях отдельных остатков. Так, например, если в результате ограничения конформационной подвижности остова данного остатка активность резко снизилась, то можно полагать, что необходимая для проявления активности конформация этого остатка после произведенной аминокислотной замены оказалась в числе стерически «запрещенных». И наоборот, если активность аналога сравнима с активностью природного гормона, то это свидетельствует о том, что конформация данного остатка стерически «разрешена» также и в молекуле аналога.

Подобные рассуждения, однако, являются корректными лишь при соблюдении определенных условий. Истолкование причин утраты либо сохранения аналогом активности в чисто «конформационных» терминах возможно лишь в тех случаях, когда аминокислотная замена не затрагивает боковую цепь, принимающую участие в генерировании вторичного сигнала (т. е. боковые цепи в положениях 4, 6 и 8 молекулы ангиотензина). Более того, иногда важным для проявления активности

Тренировка на
юба (составляющая)
татах (составляющая)
цесс (составляющая)
которая (составляющая)
полученная (составляющая)
вия (составляющая)

Сопоставление ст.

Таким образом, с учетом изложенных ограничений можно

[illegible]

Структурные аспекты активности аналогов ангиотензина

предпринять попытку выделения возможных конформаций остова остатков молекулы ангиотензина, основываясь на результатах биологического тестирования некоторых аналогов. Процесс такого выделения и его результаты описаны в табл. 3.5, которая содержит данные о величине V для каждого аналога, полученного заменой, изменяющей локальные стерические условия остова остатка в том или ином положении, сведения о

Таблица 3.4

Сопоставление стабильных конформаций фрагментов АТ 2—8
и [D-Tyr⁴]-АТ 2—8

Arg	Val	L-Tyr D-Tyr	Val	His	Pro	Phe	ΔU , ккал/моль
R	B	R	R	B	B	B	0,0
	R	H					8,4
B	R	B	B	B	R	B	5,5
	B	L					6,0
B	B	B	R	B	B	B	5,6
	R	L					>10
B	B	B	R	B	R	B	6,8
	R	L					1,1
B	B	R	R	B	B	B	7,1
	R	H					>10
R	R	R	R	B	R	B	6,5
	B	H					7,2
R	B	R	R	B	R	B	7,6
	R	H					7,3
R	R	R	R	B	B	B	9,7
	B	H					3,6
B	B	B	B	B	R	B	9,9
	R	L					4,2
R	B	R	B	B	R	B	>10
	R	H					1,5
B	B	R	R	B	R	B	>10
	R	H					3,5
B	R	R	B	B	B	B	>10
	B	H					5,1
R	R	R	B	B	R	B	>10
	B	H					0,0
R	L	L	L	B	R	B	>10
		H					5,1
B	L	L	R	B	R	B	>10
		L					6,1
B	L	L	L	B	B	B	>10
		H	B				8,4

Таблица 3.5

Выделение конформаций остова молекулы ангиотензина на основании данных о прессорной активности некоторых аналогов

Положе- ние	Аналог	V	Конформации остова		Возможные конформа- ции
			«разрешен- ные»	«запре- щенные»	
2	[D-Arg ²]-AT	1,40	H, L R	B	B, L
	[Pro ³]-AT	0,52—0,23	B, L	R	
3	[Pro ³]-AT	0,52—0,23	B, R	L	B
	[Aib ³]-AT	2,00	R, L	B, H	
4	[D-Tyr ⁴]-AT	3,60	H, L R	B	B, L
	[Pro ⁵]-AT	1,00	B, L	R	
5	[Pro ⁵]-AT	1,00	B, R	L	B, R
	[D-Pro ⁵]-AT	3,3	H, L	B, R	
6	[Pro ⁷]-AT	0,00	B, L	R	B, L
	[D-His ⁶]-AT	2,0—1,40	H, R	B, L	
7	[N-Me-Phe ⁸]-AT	1,96	B	R	R
8	[D-Phe ⁸]-AT	3,00	H	B	B

стерически «разрешенных» или «запрещенных» конформациях остова остатка в данном положении и общие выводы о возможных конформациях остова остатков. Как показано в разделе 3.2, первый остаток молекулы не принимает существенного участия в определении характера пространственной структуры молекулы; соответственно, в табл. 3.5 рассмотрены лишь сведения о конформациях остатков 2—8 ангиотензина.

По данным табл. 3.5 можно составить шестнадцать различных совокупностей конформаций остова остатков, образующих молекулу ангиотензина (точнее, ее С-концевой гептапептид); несмотря на то что, как упоминалось, такие совокупности не могут дать полного представления о конформационных возможностях молекулы, сопоставление их с предложенными моделями пространственной структуры ангиотензина, описанными в разделе 1.2, представляет определенный интерес. Очевидно, в частности, что данным табл. 3.5, т. е. результатам биологического тестирования аналогов, совершенно не удовлетворяют так называемое состояние статистического клубка [233] и α -спиральная структура [57]. Тот же вывод относится и к моделям γ - и β -витков, предусматривающим конформацию типа H для остатка Tyr⁴ [248]. Модель кросс- β -формы II, судя по значе-

Структурные аспекты активности аналогов ангиотензина

ниям углов внутреннего вращения, приведенным в [104], имеет конформацию остова С-концевого гептапептида типа RBVBBRB, т. е. также не соответствует данным табл. 3.5: конформация типа R остатка Arg² не предусматривается в табл. 3.5. Кроме того, можно утверждать, что модель кросс-β-формы I [74] также далека от структур табл. 3.5, поскольку ни одна из них не обладает наиболее характерной особенностью кросс-β-формы I — изгибом β-типа в районе остатков Tyr⁴-Val⁵. В то же время результаты теоретического конформационного анализа молекулы ангиотензина, изложенные в главе 1, называют в качестве одной из стабильных структур молекулы конформацию типа BVBBRB — одну из шестнадцати возможных структур по данным табл. 3.5. Кстати, эта же структура обнаружена расчетными средствами в [117], на что указывалось в разделе 1.2.

Таким образом, можно констатировать, что набор стабильных структур молекулы ангиотензина, описанный в главе 1, не противоречит также и данным биологического тестирования аналогов молекулы; более того, интерпретация данных биологического тестирования при использовании представлений о конформационных возможностях ангиотензина, полученных средствами теоретического конформационного анализа, позволяет дать качественное объяснение многим закономерностям проявления биологической активности этого гормона.

конформациях
воды о возмож-
но в разделе 3.2.
венного участия
структуры моле-
лишь сведения

надцать различ-
ов, образующих
й гептапептид);
совокупности не
онных возмож-
оженными моде-
а, описанными в
рес. Очевидно, в
атам биологичес-
а [233] и α-спи-
тся и к моделям
ацию типа H для
судя по значе-

Глава

4

РАЗВИТИЕ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АНГИОТЕНЗИНА

Молекулярные аспекты механизма действия ангиотензина, изложенные ранее, относились, по существу, лишь к различным деталям акта гормон-рецепторного взаимодействия с участием ангиотензина. Между тем этот акт является начальным этапом целого ряда сложных процессов, конечным результатом которых можно считать характерную для органа (или организма) реакцию на ангиотензин, например сократительную реакцию клеток гладкой мускулатуры. Далеко не все этапы этого ряда изучены в настоящее время с достаточной степенью детализации; ниже мы попытаемся затронуть лишь некоторые вопросы, связанные с развитием сократительной реакции и допускающие, в известной мере, интерпретацию в «молекулярных» терминах.

Следует заметить, однако, что проблема исследования специфических механизмов, лежащих в основе контракторного действия ангиотензина, — это прежде всего проблема первичных эффектов, вызываемых образованием комплекса «ангиотензин—рецептор», ибо вполне вероятно, что дальнейшее развитие реакции осуществляется за счет процессов, которые могут инициироваться не только ангиотензином. В этой связи представляются в высшей степени логичными попытки ряда авторов произвести проверку гипотезы об участии *цикло-АМФ* в реализации вызываемых ангиотензином внутриклеточных процессов. Оказалось, что ангиотензин существенно отличается от большинства других пептидных гормонов: его действие, по-видимому, никак не связано с *цикло-АМФ*. Не было обнаружено достоверного изменения активности ферментов системы *цикло-АМФ* под действием ангиотензина, а также изменения уровня *цикло-АМФ* [113—115]. Подавляющее большинство исследова-

телей склоняются к мнению, что наиболее существенный первичный эффект ангиотензина заключается в изменении ионных потоков через клеточную мембрану [72, 126, 174, 218].

4.1. ИЗМЕНЕНИЕ ИОННОГО БАЛАНСА КЛЕТОК ГЛАДКИХ МЫШЦ

Эффекты перерегулирования ионных потоков через мембраны гладкомышечных клеток лежат в основе большинства модельных схем контракторного действия ангиотензина, хотя наряду с ионными механизмами не исключается возможность и иных путей действия гормонов на сократительные структуры.

Выполненные к настоящему времени исследования влияния ангиотензина на ионный баланс мышечной клетки носят фрагментарный характер и не могут служить основой для вполне надежного суждения о соответствующих физико-химических механизмах. Обычно для обсуждения совокупности наблюдаемых эффектов привлекается одна из двух гипотез: открытие под действием ангиотензина ионных каналов (модель Шанже и родственные схемы) или перерегулирование процессов активного транспорта ионов. Не исключается также вероятность существования «смешанного» механизма, содержащего элементы моделей обоих типов.

Представление об открытии в результате образования комплекса «агонист—рецептор» доступа ионов, исходящих из внеклеточной среды, к находящимся в мембране ионофорам является важной составной частью модельных механизмов действия многих мембранотропных агентов [99, 179, 201]. Эта концепция наиболее четко сформулирована в работах Шанже с соавт. [101, 190] и получила значительное распространение в качестве удобной рабочей гипотезы, приемлемой для анализа результатов экспериментов с комбинированным воздействием агониста, различных ионов, блокаторов ионных каналов и т. п. Принцип, положенный в основу модели Шанже, схематически иллюстрируется рис. 4.1.

Молекулярные структуры и процессы, с помощью которых реализуются подобные механизмы, совершенно не исследованы; большинство обсуждавшихся моделей связывает их функционирование с аллостерическими эффектами или другими явлениями, индуцирующими структурные изменения на некотором удалении от места связывания агониста [101, 190, 201].

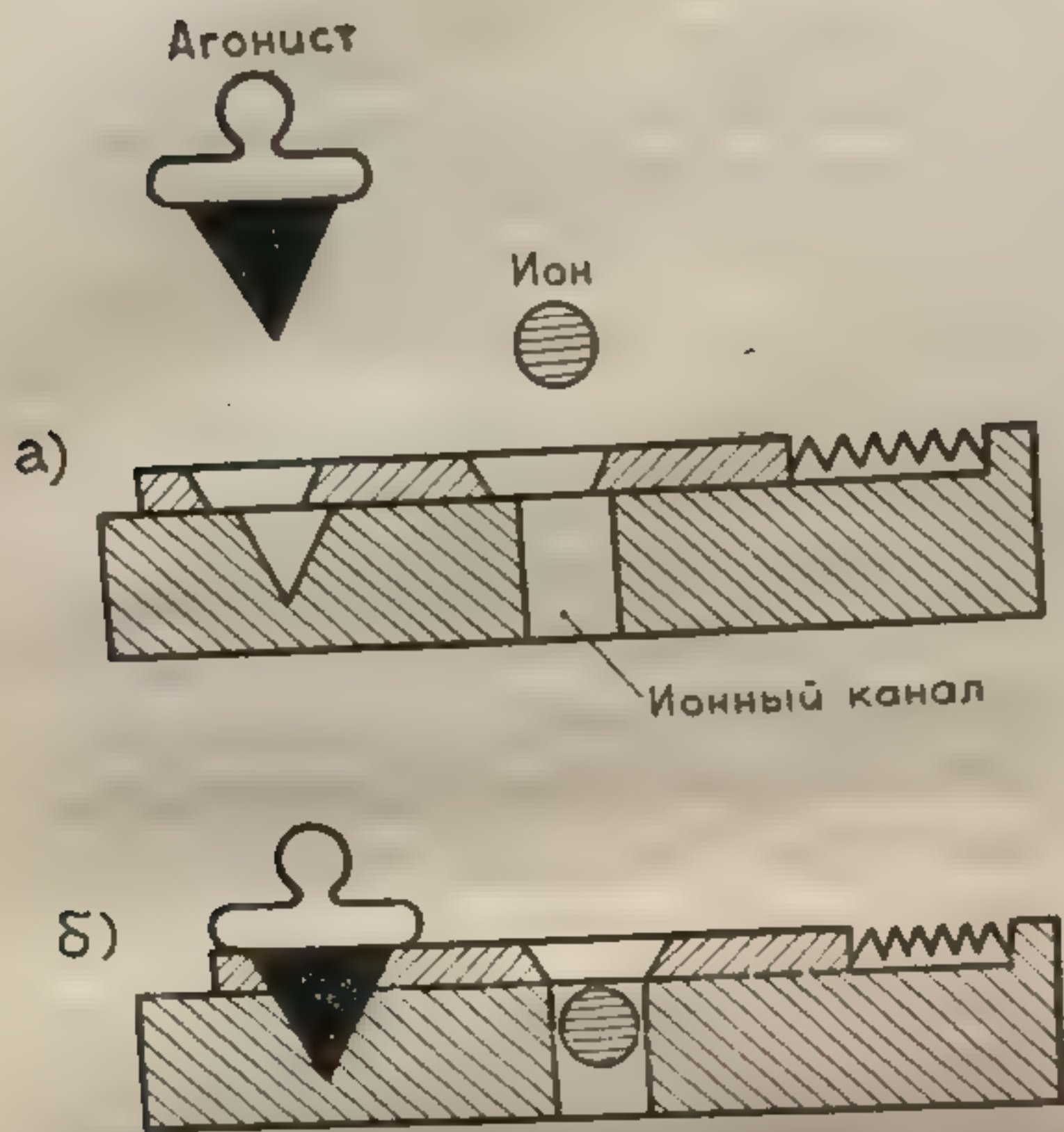


Рис. 4.1. Модель мембранного рецептора, регулирующего доступ к ионным каналам.

Ионная специфичность действия каждого мембранотропного агента определяется, таким образом, типом (или типами) ионных каналов, управляемых соответствующим рецептором. Факт существования аналогов, обладающих неполной внутренней активностью, указывает на возможность «неполного открытия» ионного канала при образовании таким аналогом комплекса с рецептором.

Механизм, формально близкий только что рассмотренному, предполагает непосредственную модификацию мембраны ангиотензином. Некоторыми исследователями в по-

следние годы высказывалось предположение, что сам ангиотензин обладает свойствами ионофора [126, 139], изменяя, в частности, распределение ионов кальция в системе «хлороформ—вода»; липидные мембраны, модифицированные ангиотензином, обладали повышенной проницаемостью по отношению к ионам Na, K, Cl [280].

Было также показано, что ангиотензин и его С-концевой фрагмент AT 2—8 в концентрации 10^{-6} — 10^{-5} моль/л вызывали заметные сдвиги ионных проницаемостей мембран клеток водоросли *Nitella flexilis*, причем восемь других пептидных гормонов никак не влияли на электродиффузионные характеристики мембраны [55]. Следует все же отметить, что сама гипотеза о непосредственной модификации ангиотензином клеточной мембраны как о начальном акте, инициирующем сокращение, очень плохо согласуется с двумя обстоятельствами: высокой специфичностью гормона и крайне низкими значениями насыщающих концентраций.

Прямая экспериментальная информация о влиянии ангиотензина на процессы переноса ионов через мембрану гладкомышечной клетки с достаточной определенностью позволяет утверждать сам факт существования такого влияния; большин-

Сократительная реакция мускулатуры под действием ангиотензина

ство предположений, высказывавшихся по этому поводу, базируется на данных о действии ангиотензина на ионный баланс мышцы или на измерениях ионных потоков.

Данные, касающиеся потоков одновалентных катионов К и Na, весьма противоречивы. В ряде работ содержится указание на то, что ангиотензин увеличивает выходящий поток натрия в различных гладких мышцах [153, 322]; в других экспериментах было показано увеличение входящего потока натрия под действием ангиотензина [173, 174, 326]. Аналогичное заключение было сделано также на основании результатов экспериментов с комбинированным воздействием ангиотензина и ацетилхолина на продольную гладкую мышцу подвздошной кишки морской свинки [165]; впрочем, предлагаемая трактовка этих экспериментов не является, на наш взгляд, единственно возможной. Увеличение под действием ангиотензина выходящих потоков натрия было показано также на клетках симпатических ганглиев [136].

С другой стороны, гипотеза об увеличении под действием ангиотензина выходящих потоков натрия, направленных против градиента концентрации, предполагает стимуляцию этим гормоном калий-натриевого насоса. В ряде экспериментов получено косвенное или прямое указание на существование подобного эффекта [72, 218, 311, 322], причем было обнаружено, что ангиотензин вызывает увеличение активности К-Na-АТФ-азы лишь в микросомах клеток-мишеней [72], в том числе клеток коры надпочечников. Последнее утверждение противоречит результатам работы [166]; ряд авторов отрицают возможность стимулирования ангиотензином калий-натриевого насоса также и в клетках гладких мышц [112, 174].

В большинстве экспериментов не было обнаружено заметного влияния ангиотензина на потоки калия [112, 136, 174, 290].

Согласно многим экспериментальным оценкам, очень важную роль в механизмах проявления функциональной активности ангиотензина играет эффект регуляции кальциевых потоков [198, 298, 326]. Исследованиями Лимаса и Кона [203] показано ингибирующее действие ангиотензина на активность кальцевой АТФ-азы в «мембранной» фракции микросом аорты собаки; более того, ангиотензин оказывал аналогичное действие и на активность щелочной фосфатазы — фермента, который, по существующим представлениям, играет важную роль в функционировании «кальцевого насоса» [264].

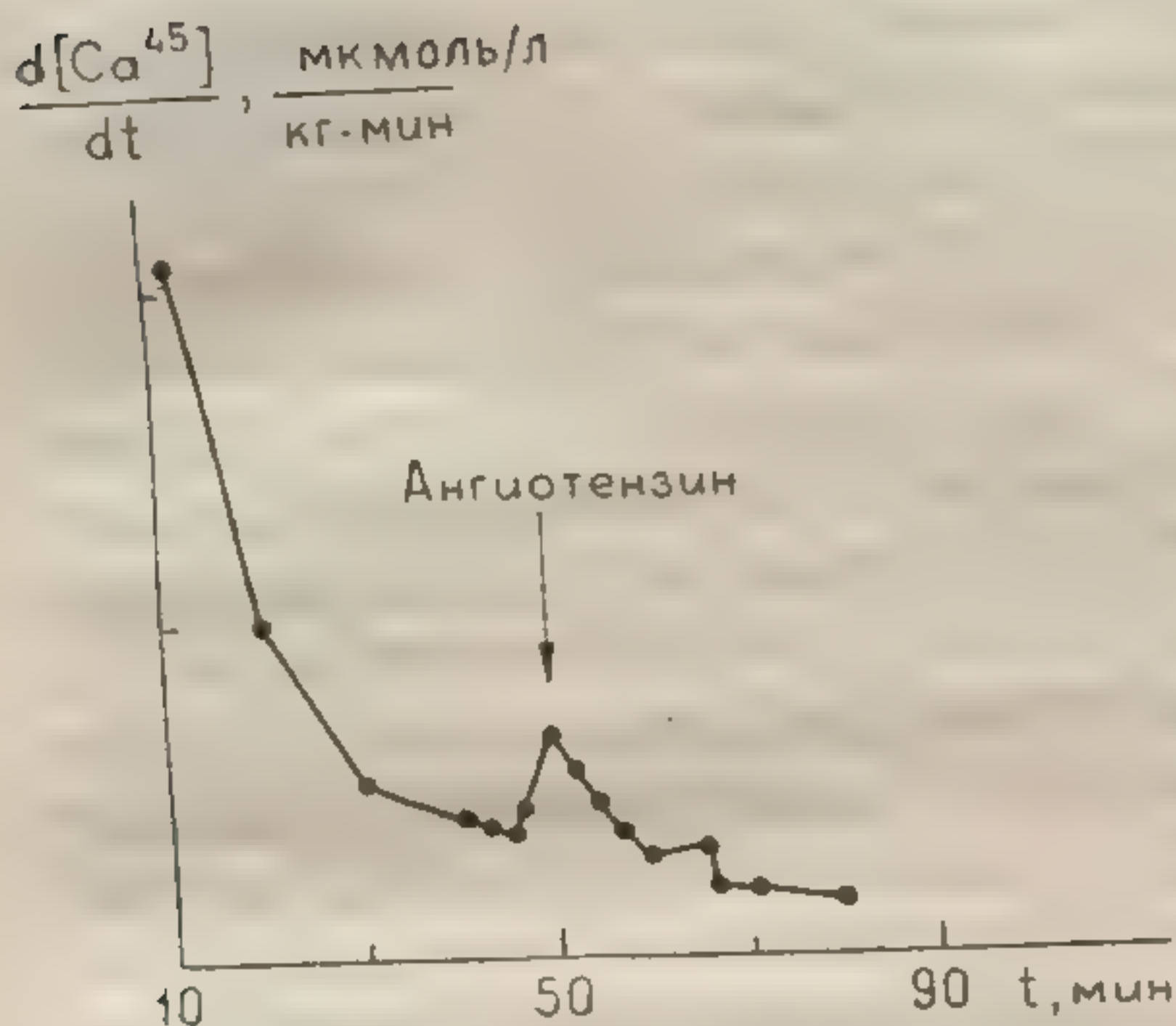


Рис. 4.2. Влияние ангиотензина на скорость эффузии ^{45}Ca из ткани аорты кролика [126].

В эксперименте на аорте кролика [126] ангиотензин вызывал увеличение выхода ^{45}Ca (рис. 4.2); по мнению авторов работы [126], этот эффект связан с высвобождением кальция из внутриклеточного депо. Это предположение согласуется с результатами работы, в которой было показано высвобождение под действием ангиотензина кальция из микросомальной фракции плазматических мембран клеток гладких мышц аорты кролика [96]. Представляет также интерес тот факт, что

агенты, блокирующие поглощение кальция гладкомышечной клеткой, ингибируют также и сократительную реакцию на ангиотензин [290].

Следует подчеркнуть, что все оценки и суждения, касающиеся индивидуальных ионных потоков, должны восприниматься с большой осторожностью, поскольку общий баланс перемещения различных ионов через мембрану регулируется сложными отношениями, налагаемыми условиями сохранения электронейтральности и отсутствия электрического тока. В результате потоки отдельных ионов оказываются не независимыми и, например, увеличение выходящего потока одновалентных катионов может оказаться просто следствием возрастания входящего потока кальция, так, чтобы выполнялось условие отсутствия электрического тока:

$$\sum \omega_i \Phi^i = 0, \quad (4.1.1)$$

где ω_i — заряд иона.

Тщательный анализ ситуации особенно затруднен в случае обсуждения гипотез о возможном действии ангиотензина на процессы активного транспорта. Помимо отсутствия надежных теоретических основ для количественной трактовки этих процессов, главным препятствием здесь оказывается недостаток информации об изменении системы пассивных потоков, состав-

ляющих «фон» для сравнимых с ними по интенсивности метаболически зависимых процессов перемешивания ионов.

Сравнительно простой объект для подобного рода анализа представляют собой механизмы, лежащие в основе модели Шанже; исходя из представлений современной теории мембранных процессов можно определить, по крайней мере в самых общих чертах, характер зависимости, связывающей число занятых

рецепторов с величинами потоков ионов через клеточную мембрану и коэффициентов ее проницаемости для различных ионов.

Проанализируем на примере простой модели процесс диффузии иона через мембрану, обладающую, как это предполагается моделью Шанже, ограниченным числом ионных каналов (ионофоров) некоторого сорта. Потенциальный профиль такой мембраны схематически представлен на рис. 4.3. Будем рассматривать поток катиона i -го типа, направленный из наружной среды в клетку. Величины ΔF_i суть энергии активации процессов перехода иона из наружного раствора в ионный канал (ΔF_1), выхода из ионного канала в наружный (ΔF_2) и внутренний раствор (ΔF_3), а также перехода из внутреннего раствора в ионный канал (ΔF_4). Помимо этого, на мембране имеет место скачок электрического потенциала Ψ ; с учетом этого обстоятельства, в приближении постоянных полей, можно записать следующие выражения для соответствующих констант скоростей:

$$k_1 = \frac{\kappa kT}{h} e^{-\frac{\Delta F_1}{RT}} e^{-\frac{\Psi F}{4RT}}; \quad (4.1.2)$$

$$k'_1 = \frac{\kappa kT}{h} e^{-\frac{\Delta F_2}{RT}} e^{-\frac{\Psi F}{4RT}};$$

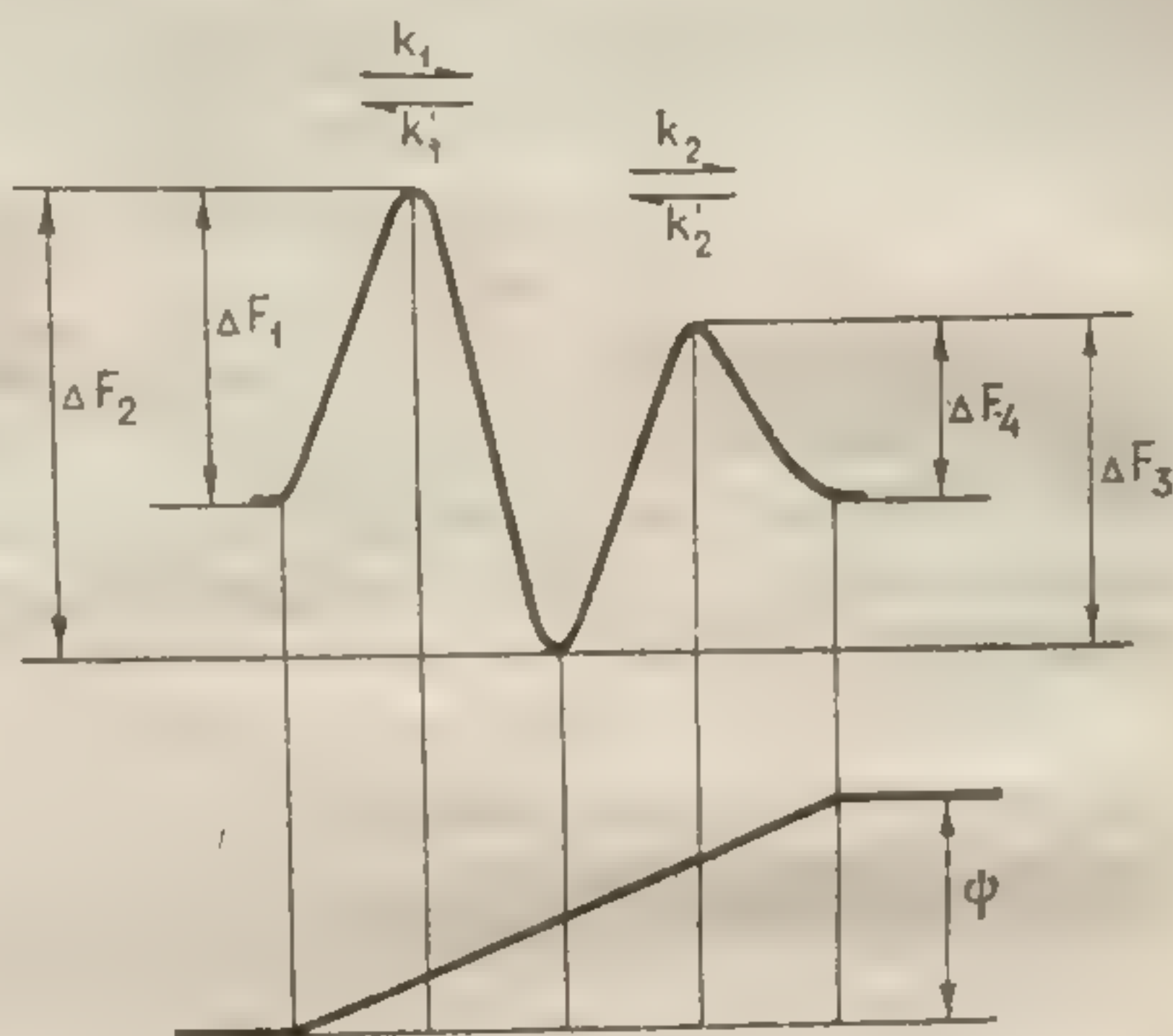


Рис. 4.3. Схема потенциального профиля клеточной мембраны.

$$k_2 = \frac{\kappa k T}{h} e^{-\frac{\Delta F_3}{RT}} e^{-\frac{\Psi F}{4RT}};$$

$$k'_2 = \frac{\kappa k T}{h} e^{-\frac{\Delta F_4}{RT}} e^{-\frac{\Psi F}{4RT}},$$

где κ — так называемый коэффициент прохождения через потенциальный барьер, принятый в теории абсолютных скоростей реакций.

Обозначая общее число вакансий (ионных каналов) в мембране через Q , выразим поток через первый и второй потенциальные барьеры в виде

$$\begin{aligned}\Phi_1 &= \lambda [k_1 C_0 (Q - q) - k'_1 q]; \\ \Phi_2 &= \lambda [k_2 q - k'_2 C_i (Q - q)],\end{aligned}\tag{4.1.3}$$

где q — концентрация иона в мембранной фазе, λ — расстояние между барьерами.

В стационарном случае для каждого иона

$$\Phi_1^i = \Phi_2^i = \Phi^i.\tag{4.1.4}$$

Исключая q , с учетом (4.1.2) находим

$$\Phi^i = \frac{\frac{kT}{h} e^{-\frac{\Delta F_1}{RT}} \left(C_0 e^{\frac{\Psi F}{2RT}} - C_i e^{-\frac{\Psi F}{2RT}} \right)}{K \left(\frac{k_1}{k'_2} C_0 e^{\frac{\Psi F}{4RT}} + C_i e^{-\frac{\Psi F}{4RT}} \right) + \frac{k_1}{k'_2} e^{-\frac{\Psi F}{4RT}} + e^{\frac{\Psi F}{4RT}}}.\tag{4.1.5}$$

В терминах этого уравнения предполагаемый моделью Шанже эффект связывания рецептором молекулы агониста должен заключаться в снижении энергий активации ΔF_1 процесса перехода иона из раствора в ионный канал. Справедливо, конечно, предположить, что таким образом регулируется доступ не ко всем ионным каналам данного сорта; более того, в общем случае помимо ионных каналов существуют также и другие пути переноса ионов через мембрану.

Пусть Q' — количество ионных каналов, управляемых рассматриваемым классом рецепторов; суммарный поток, идущий

Сократительная реакция мускулатуры под действием ангиотензина

помимо этих каналов, обозначим через Φ_0^i . Тогда общий поток выразится соотношением

$$\Phi^i = \Phi_0^i + Q' [(1-\gamma) k_1^0 + \gamma k_1^a] \times \\ \times \frac{C_0 e^{\frac{\Psi F}{2RT}} - C_i e^{-\frac{\Psi F}{2RT}}}{K \left(\frac{k_1}{k'_2} C_0 e^{\frac{\Psi F}{4RT}} + C_i e^{-\frac{\Psi F}{4RT}} \right) + \frac{k_1}{k'_2} e^{-\frac{\Psi F}{4RT}} + e^{\frac{\Psi F}{4RT}}} \quad (4.1.6)$$

где γ — доля ионных каналов, «управляющий» рецептор которых образовал комплекс с агонистом; k_1^0 и k_1^a — «входные» константы скорости, соответствующие случаям свободного и занятого рецептора.

На основании уравнения (4.1.6) можно сделать заключение, что регулируемый ионный поток Φ^i линейным образом зависит от доли занятых рецепторов γ . В действительности, однако, ситуация оказывается несколько сложнее. Прежде всего, в предыдущих рассуждениях все компоненты потока Φ^i полагались независимыми; в частности, полагалось, что действие каждого рецептора распространяется на строго определенное число каналов, а какие-либо коллективные эффекты невозможны. Последнее предположение, очевидно, тем более справедливо, чем ниже плотность размещения рецепторов на поверхности мембран.

Если, к примеру, рецепторы располагаются в узлах сетки, изображенной на рис. 4.4, а активируемые ими каналы — в прилегающих к соответствующему узлу ячейках, то линейность потока по γ будет иметь место лишь при малой плотности рецепторов, поскольку при высокой плотности и больших дозах некоторые каналы окажутся «активированными дважды».

С этой точки зрения поверхностную плотность размещения рецепторов ангиотензина можно, по-видимому, считать достаточно низкой. Так, по оценкам, полученным из данных [200], на 1 мм^2 гладкомышечной клетки приходится примерно 10^7 рецепторов, что соответствует среднему расстоянию между ними 3000 \AA . Для сравнения укажем, что характерный размер молекулы мембранного белка $\sim 50 \text{ \AA}$; можно тем самым полагать, что вклады, вносимые каждым рецептором в изменение ионных проницаемостей, являются независимыми. Справедливость рассуждений подобного рода была подтверждена в отношении рецепторов некоторых других биорегуляторов, стимулирующих

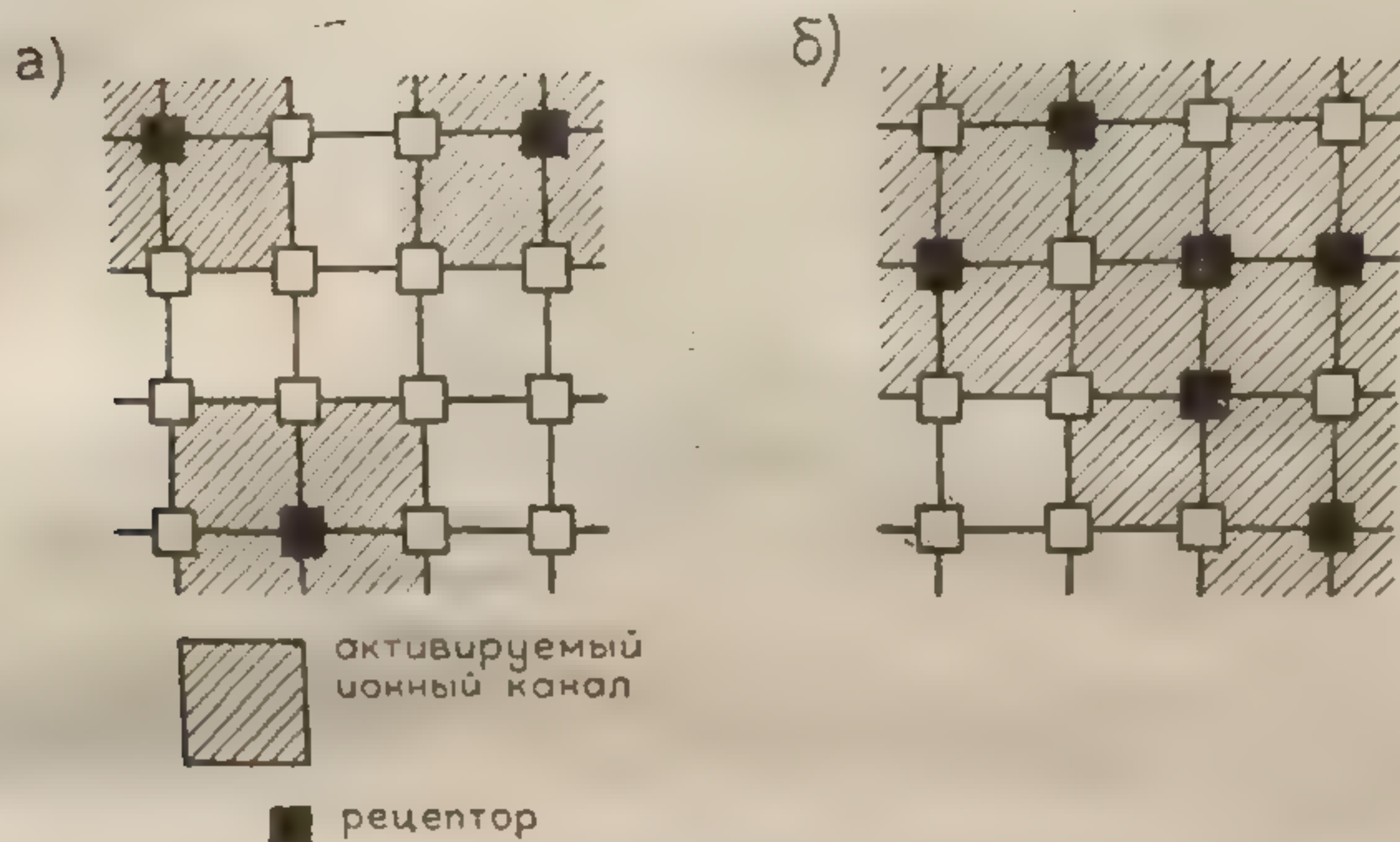


Рис. 4.4. Активация агонистом ионных каналов при низкой (а) и высокой (б) плотности рецепторов на поверхности мембраны.

гладкую мускулатуру; в случае адреналина оказалось даже возможным оценить величину элементарного вклада ΔG — изменения электрической проводимости мембраны, обусловленного единичным актом образования комплекса «агонист—рецептор».

И все же зависимость потока Φ^i от числа занятых рецепторов не может, строго говоря, рассматриваться как линейная. Дело в том, что вызванная изменением потока перестройка ионного баланса клетки приведет в конечном счете к изменению величины потенциала покоя Ψ — важнейшего параметра уравнения (4.1.5), так что новое стационарное значение Φ^i уже не будет линейной функцией γ . Зависимость величины потока от мембранного потенциала не связана с особенностями рассмотренной нами модели; уже наиболее простое приближение — феноменологическая теория Гольдмана дает для потока выражение, зависящее от электрического потенциала:

$$\Phi_j = \frac{F\Psi P_j}{RT} \frac{(C_j^0 e^{-\frac{F\Psi}{RT}} - C_j^i)}{1 - e^{-\frac{F\Psi}{RT}}}, \quad (4.1.7)$$

где P_j — коэффициент проницаемости мембраны. Эта величина, в свою очередь, предполагается уже независимой от Ψ и явля-

ется коэффициентом пропорциональности между потоком и разностью концентраций по обе стороны мембраны в отсутствие электрического поля:

$$\Phi_j = P_j (C_j^0 - C_j^i). \quad (4.1.8)$$

Поэтому для большей определенности иногда говорят не об изменении ионных потоков под действием ангиотензина, а об изменении проницаемостей мембраны в отношении различных ионов. Следует, однако, иметь в виду, что коэффициент P_j является константой лишь в феноменологической теории диффузии, тогда как в случае биологических мембран, толщина которых имеет порядок линейных размеров образующих их молекул, величины P_j оказываются существенно зависящими от распределения ионов и электрического профиля мембраны $\Psi(x)$.

Например, сравнивая уравнение потока (4.1.5), выведенное в предположении ограничения числа вакансий в мембранной фазе, с уравнением Гольдмана (4.1.7), получаем следующее выражение для эффективного значения коэффициента проницаемости:

$$P = \frac{RT \left(1 - e^{\frac{\Psi F}{RT}} \right)}{F \Psi \left[K \left(\frac{k_1}{k'_2} C_0 e^{\frac{\Psi F}{4RT}} + C_i e^{-\frac{\Psi F}{4RT}} \right) + \frac{k_1}{k'_2} e^{-\frac{\Psi F}{4RT}} + e^{\frac{\Psi F}{4RT}} \right]} = P_0 S(\Psi). \quad (4.1.9)$$

Изменение ионных проницаемостей приводит, как упоминалось, к изменению потенциала покоя клетки; таким образом, если в результате действия агониста окажется измененной входная константа k_1 , это обусловит, в свою очередь, изменение потенциала покоя, благодаря чему окажутся измененными также эффективные коэффициенты ионных проницаемостей мембраны, причем это изменение уже не будет пропорциональным количеству занятых рецепторов. Несколько примеров зависимости электростатического фактора $S(\Psi)$ от мембранного потенциала представлено на рис. 4.5; при определенных сочетаниях параметров, входящих в (4.1.9), и при малых значениях Ψ эта зависимость оказывается слабовыраженной и функция P — почти линейной, но в общем случае ее форма примет более

(4.1.7)

а величина,
 Ψ и явля-

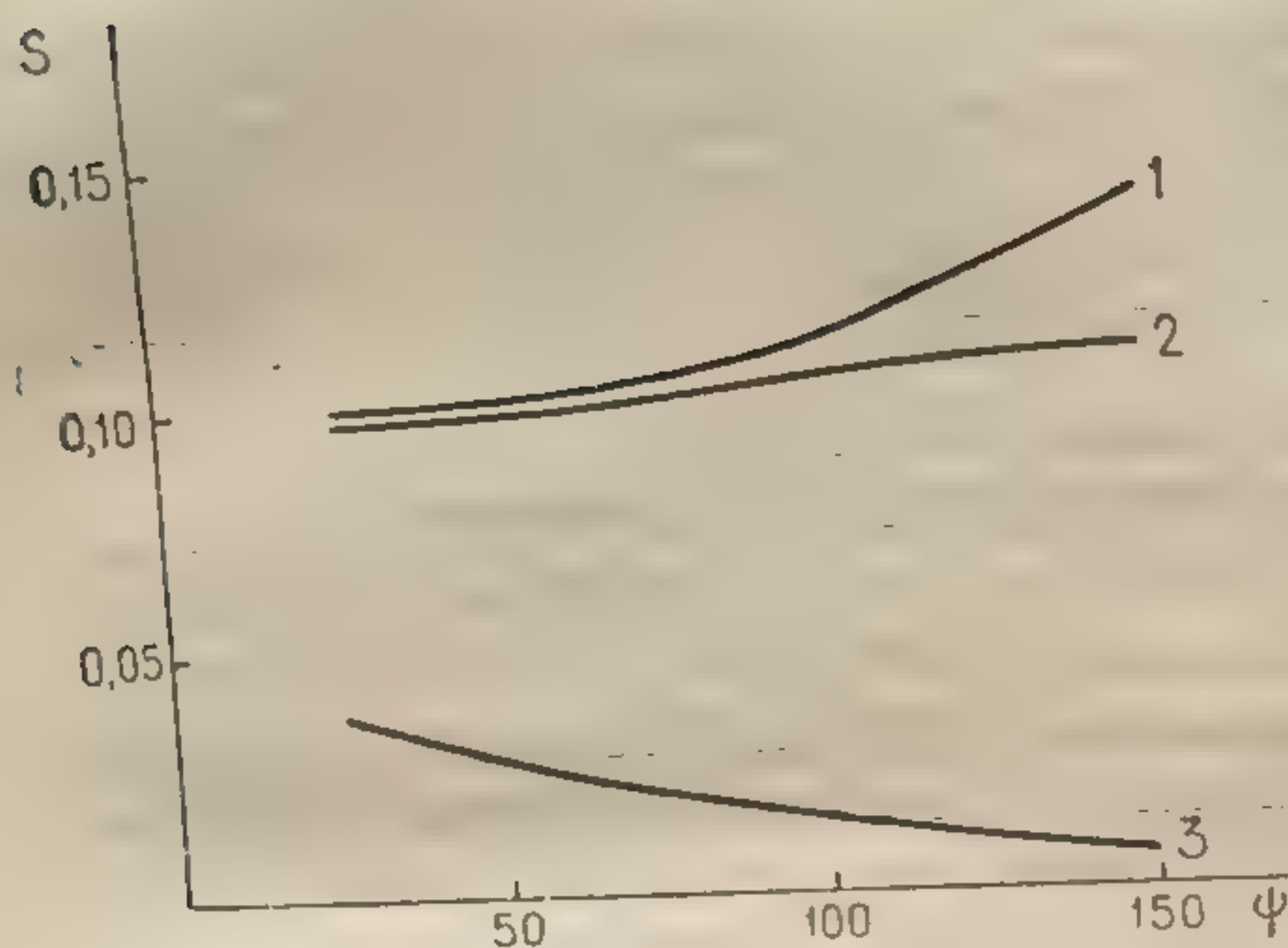


Рис. 4.5. Зависимость электростатического фактора S от мембранного потенциала при различных значениях k_i .

сложный вид, причем для различных комбинаций величин параметров уравнения (4.1.9) «поправочный» фактор $S(\Psi)$ может убывать либо расти с увеличением Ψ .

Несмотря на эти обстоятельства, индуцированное агонистом изменение процессов переноса ионов через клеточную мембрану следовало бы трактовать именно в терминах увеличения или снижения ионных проницаемостей, а не потоков, поскольку последние все

же в гораздо большей мере обнаруживают зависимость от вторичного эффекта — сдвига мембранного потенциала.

Показательным в этом отношении примером служат результаты экспериментов, в которых исследовалось влияние наружной концентрации K^+ на величину выходящего потока натрия клеток гладких мышц артерий [192]. Снижение величины этого потока с уменьшением концентрации калия в наружном растворе некоторыми авторами рассматривается как парадоксальное явление [12]; между тем, с учетом гиперполяризации клеточной мембраны, вызываемой понижением наружной концентрации K^+ (см. следующий раздел), такой эффект представляется совершенно закономерным. Уравнение (4.1.7) как раз предсказывает снижение выходящего потока натрия (или любого другого катиона) с увеличением мембранного потенциала Ψ .

Принимая во внимание все эти соображения, наличные экспериментальные данные о действии ангиотензина на процессы переноса ионов через мембрану клеток гладких мышц следует трактовать лишь как рекогносцировочные и пока далекие от однозначности. Построение на их основе не только количественных, но даже качественных моделей в настоящее время невозможно.

4.2. ЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ГЛАДКОМЫШЕЧНОЙ КЛЕТКИ

Концентрации важнейших неорганических ионов в мио-плазме клеток гладких мышц составляют: K^+ — 0,08—0,16 н., Cl^- — 0,07—0,13 н., Na^+ — 0,07—0,13 н., Ca^{2+} — 0,01—0,05 н. [135, 183]. (Это наиболее часто называемые величины; в зависимости от объекта и методов измерения некоторыми исследователями приводятся оценки, различающиеся даже на порядок.) Во внеклеточной жидкости содержание ионов калия значительно ниже (в 3—10 раз), натрия — выше (в 5—10 раз), хлора и кальция — также выше (в 2—10 раз). К сожалению, результаты прямых экспериментальных измерений распределения ионов в гладкомышечной ткани настолько противоречивы, что приведенное описание не может быть пока существенным образом уточнено. Некоторые суждения в отношении справедливости приведенных оценок могут быть, однако, сделаны на основании косвенных данных измерения электрических характеристик гладкомышечных клеток.

В силу неравномерности распределения ионов между клеткой и внеклеточной жидкостью на клеточной мембране возникает скачок электрического потенциала. Его величина с достаточной степенью точности определяется уравнением Гольдмана

$$\Psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{C_K^0 + \alpha C_{Na}^0 + \gamma C_{Cl}^i}{C_K^i + \alpha C_{Na}^i + \gamma C_{Cl}^0}, \quad (4.2.1)$$

где $\alpha = P_{Na}/P_K$, $\gamma = P_{Cl}/P_K$ — отношения соответствующих ионных проницаемостей мембраны. Коэффициенты проницаемости мембраны клеток гладких мышц для основных ионов различаются довольно значительно; например, по оценкам Дроогманса и Кастелса [135], в случае мембраны клеток ленты ободочной кишки в зависимости от ионного состава окружающей среды они составили: для калия — $4,9—11,0 \cdot 10^{-8}$ см/с, для натрия — $1,2—1,8 \cdot 10^{-8}$ см/с, для хлора — $6,7 \cdot 10^{-8}$ см/с.

Соответственно, величина мембранного потенциала варьирует в пределах 10—80 мВ в зависимости от типа ткани; как явствует из приведенных оценок, основным потенциалопределяющим ионом является K^+ , так же как это имеет место для большинства биологических мембран.

Как показано рядом исследований, ангиотензин вызывает деполяризацию клеток гладких мышц. На клетках ленты

ободочной кишки морской свинки этот эффект проявляется уже при концентрациях ангиотензина $5 \cdot 10^{-9}$ моль/л [226]. Наиболее значительная деполяризация наблюдалась на клетках миоэпителия матки крысы — свыше 20 мВ (концентрация ангиотензина 10^{-6} моль/л) [174]; на клетках каротидной артерии овцы ангиотензин в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л вызывал деполяризацию порядка 9 мВ [191]. В случае клеток мышц предсердия кролика, у которых ангиотензин вызывает сильную сократительную реакцию, признаков деполяризации практически не обнаружено [87].

Амон и Ворсел [174], исследуя зависимость деполяризующего влияния ангиотензина на клетки миоэпителия матки крысы от ионного состава среды, пришли к выводу, что деполяризация происходит вследствие увеличения проницаемости клеточной мембраны в отношении ионов натрия. Полная замена Na^+ в наружном растворе ионами лития или магния приводила к исчезновению электрической реакции клетки на ангиотензин; в то же время при отсутствии в среде ионов хлора, калия или кальция клетка сохраняла способность к деполяризации.

Совершенно аналогичные результаты были получены на клетках симпатических ганглиев, у которых ангиотензин вызывал деполяризацию и снижение электрического сопротивления клеточной мембраны [136]; этот эффект сохранялся в бескальциевых и бесхлорных средах, но исчезал в безнатриевых.

Умеренные сдвиги коэффициента проницаемости P_{Na} должны вызвать деполяризацию, почти линейным образом от них зависящую; так, с учетом приводившихся оценок

$$C_{\text{K}}^i + \alpha C_{\text{Na}}^i \gg \frac{\Delta P_{\text{Na}}}{P_{\text{K}}} C_{\text{Na}}^i$$

и

$$\Delta \Psi \approx -\frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\Delta P_{\text{Na}}}{P_{\text{K}}} \frac{C_{\text{Na}}^0}{C_{\text{K}}^0 + \alpha C_{\text{Na}}^0} + 1 \right). \quad (4.2.2)$$

Эта зависимость существенно отличается от линейной лишь при больших значениях ΔP_{Na} .

Механизм развития потенциала действия клеток гладких мышц в основных деталях сходен с аналогичными процессами в нервных клетках и в волокнах скелетных мышц. В его ос-

нове лежит электроиндуцированное изменение проницаемости мембраны к некоторым ионам. Именно деполяризация мембраны ниже некоторого порогового уровня вызывает быстрое увеличение кальциевой и натриевой проницаемостей [61, 214], и в силу роста параметров α и γ в уравнении (4.2.1) происходит дальнейшее падение мембранного потенциала. Деполяризация мембраны вызывает также рост калиевой проницаемости, однако этот процесс развивается более медленно. Тем не менее после выхода кривой кальциевой и натриевой проницаемостей на уровень насыщения рост коэффициента P_K приводит к уменьшению параметров α и γ и, как следствие, к деполяризации мембраны и возвращению обоих коэффициентов проницаемости к исходным значениям.

Амплитуда волны потенциала действия клеток различных типов гладких мышц колеблется в весьма значительных пределах — от нескольких милливольт до 60 мВ и выше. Более того, отдельные волны потенциала действия одной и той же гладкомышечной клетки могут также существенно различаться, в отличие от мышечных волокон прочих типов и нервных клеток.

Еще значительнее различия в продолжительности волны потенциала действия — от нескольких миллисекунд до нескольких секунд.

Система уравнений, описывающая развитие потенциала действия, весьма сложна и включает значительное число констант (см., например, [47]). Обычно для характеристики формы волны потенциала действия используются три показателя — амплитуда, скорость нарастания восходящей части и длительность. В некотором упрощенном представлении развитие волны потенциала действия описывается уравнением Чизмаджева и Маркина [48]:

$$\frac{d^2\Psi}{d\xi^2} + vRc \frac{d\Psi}{d\xi} - RI_m(\xi) = 0, \quad (4.2.3)$$

где R — сопротивление; c — емкость мембраны; I_m — ток; $\xi = x - vt$, x — координата, направленная вдоль оси клетки; v — скорость распространения волны потенциала действия.

Представляя приближенно $I_m(\xi)$ в виде ступенчатой функции, можно получить «кусочные» решения общего вида [242]:

$$\Psi_k = A_k + B_k e^{-\beta_k \xi} + D_k \xi, \quad (4.2.4)$$

причем индекс k относится к различным интервалам ξ .

Впервые исследование влияния ангиотензина на форму волны потенциала действия гладких мышц было предпринято, по-видимому, Охаси с соавт. [226]; они установили, что ангиотензин в концентрациях порядка 10^{-8} моль/м вызывает заметное снижение амплитуды потенциалов действия клеток лентной ободочной кишки морской свинки. Оказалось также, что ангиотензин влияет на характеристики потенциала действия сердечной мышцы. Более детально этот вопрос исследовался Боннардо и Реголи [87] на клетках мышц предсердий кролика. В этом случае амплитуда волны потенциала действия практически не изменялась под действием ангиотензина и двух высокоактивных его аналогов, однако на 20—25% увеличивалась скорость нарастания волны в начальной фазе и значительно возрастала ее длительность. Последнее обстоятельство указывает, как полагают авторы [82, 211], на увеличение входящего потока кальция в процессе развития волны потенциала действия. Напомним, что ангиотензин не оказал заметного влияния на величину потенциала покоя клеток предсердий.

В определенных условиях клетки многих гладких мышц самопроизвольно генерируют пикоподобные потенциалы действия (спайки), причем этот процесс может носить сравнительно регулярный или полностью нерегулярный характер.

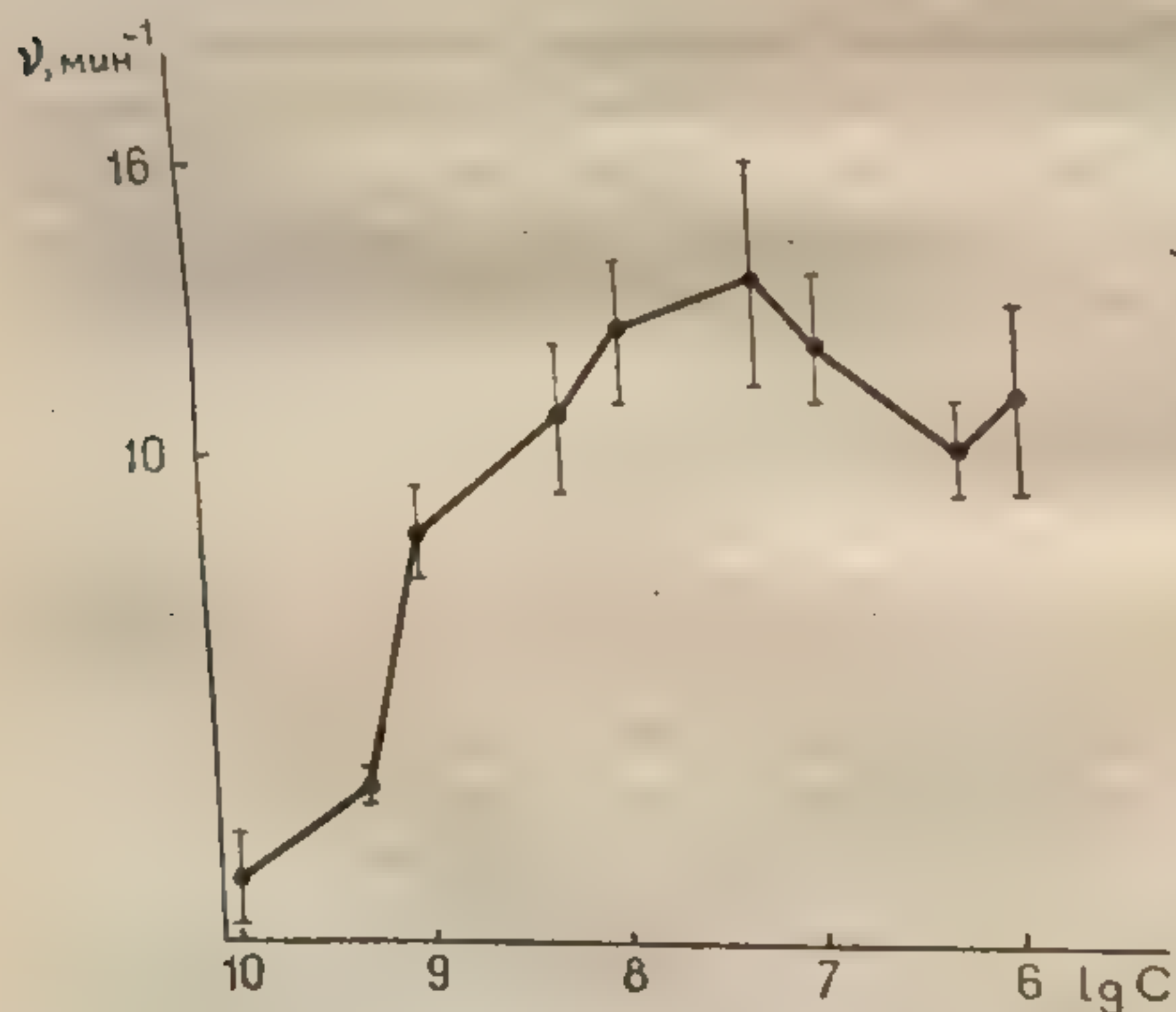


Рис. 4.6. Зависимость частоты спайков волокна мышцы предсердия кролика от концентрации ангиотензина [87].

Ангиотензин, действуя на гладкомышечные клетки, увеличивает частоту спайков [210, 226]; интересно, что такое же действие было показано и на некоторых типах нервных клеток [136, 299].

Концентрационная зависимость этого эффекта ангиотензина вряд ли допускает сколько-нибудь строгую количественную трактовку при нынешнем состоянии проблемы; можно лишь сказать, что соответствующие кривые имеют в полулогарифми-

ческих координатах традиционную S-образную форму (рис. 4.6), а приближенные оценки pD_2 близки величинам, получаемым в тестах на сократительную активность и в экспериментах с радиоактивным ангиотензином.

Характерное для многих типов гладких мышц повышение возбудимости при частичной деполяризации позволило некоторым исследователям высказать предположение о стимуляции ангиотензином частоты спайков посредством снижения потенциала покоя. Однако это заведомо не так в случае сердечных мышц, когда деполяризующее действие ангиотензина отсутствует; более того, он восстанавливает электрическую активность клеток предсердия кролика, деполяризованных высокими наружными концентрациями калия [210].

Другая гипотеза указывает на возможность увеличения частоты спайков в результате активации ангиотензином кальциевых каналов; в пользу этого свидетельствуют некоторые эксперименты, выполненные с использованием блокаторов ионных каналов [210], однако их результаты не позволяют сделать этот вывод окончательным. Как известно, поступление кальция в миоплазму — важнейшее звено развития сократительной реакции, и тот факт, что изменение под действием ангиотензина электрических характеристик клетки связывается с его влиянием на механизмы кальциевой проницаемости, позволяет задать вопрос, насколько обусловленные ангиотензином электрофизиологические эффекты могут рассматриваться как «передаточный элемент» в цепи явлений, вызывающих в конечном счете сокращение. Ибо, в принципе, не исключено, что они являются лишь побочными событиями, не несущими в этом смысле никакой «полезной нагрузки». Впрочем, такое предположение представляется маловероятным в связи, например, с результатами, свидетельствующими о подавлении сократительной реакции на ангиотензин у деполяризованных калием гладких мышц [98, 150], однако окончательный ответ на этот вопрос пока невозможен.

4.3. ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ КАЛЬЦИЯ В МИОПЛАЗМЕ И РАЗВИТИЕ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ

Согласно существующим представлениям, агентом, непосредственно действующим на сократительные структуры клетки, для всех типов мышц являются ионы кальция. Существует, однако,

заметная разница между поперечнополосатыми и гладкими мышцами в отношении механизмов поступления кальция в миоплазму. Если в первом случае практически весь поступающий кальций высвобождается из внутриклеточных депо под действием деполяризации клетки, а возможно, и некоторых других стимулов, то для гладкомышечных клеток этот механизм является, во всяком случае, не единственным. Как упоминалось в разделе 4.2, значительная часть входящего тока, возникающего в процессе развития потенциала действия на клетках гладких мышц, переносится как раз ионами кальция; таким образом, при возбуждении в миоплазму поступает некоторое количество наружного Ca^{2+} . Предполагается также, что при некоторых способах стимулирования сокращения гладких мышц интенсификация входящего потока кальция достигается не только за счет увеличения частоты спайков, но и за счет возрастания стационарных проницаемостей P_{Ca} .

Вопрос о структуре кальциевого баланса миоплазмы клеток гладких мышц при возбуждении не выяснен. Сократительная реакция различных типов гладких мышц в большей или меньшей степени чувствительна к присутствию кальция в наружной среде [12]; с другой стороны, от этого фактора по-разному зависит контракторная активность ряда соединений [100, 137, 178, 320].

Здесь следует отметить одно обстоятельство, обычно выпускаемое из виду при обсуждении данных экспериментов по изучению влияния наружной концентрации кальция на сократительную реакцию. Резкое снижение или полное подавление такой реакции в средах, лишенных кальция (или с сильно пониженной его концентрацией), рассматривается в ряде работ как указание на доминирующую роль притока внеклеточного кальция в развитии сокращения; такие соображения высказывались также и по поводу экспериментов с ангиотензином [151, 219]. Между тем ситуация оказывается более сложной. Дело в том, что в бескальциевых средах гладкомышечные клетки полностью утрачивают возбудимость [12, 29]. Помимо упоминавшегося обстоятельства, что в клетках этого типа ионы кальция являются важным компонентом токов действия, следует указать на факт обусловленности возникновения потенциалов действия на всех без исключения биологических мембранах присутствием в среде некоторого минимального количества ионов кальция. Таким образом, сократительная реакция в бескальциевых средах

$$\frac{d[\text{Ca}]_m}{dt} = \gamma \Phi_a(t) -$$

$$\frac{d[\text{Ca}]_D}{dt} = k \cdot [\text{Ca}]$$

где γ — поверхность
 $[\text{Ca}]_D$ — концентрация
 в депо, соответствующая
 скоростей ясен из
 Приток в клетку
 описывается членом
 предполагать, что он с
 потоками кальция, по
 процессе развития пот
 приближенно мож
 некоторой периодич
 тотой γ , зависяще
 ангиотензина. По
 мися с сообра
 считаться в предьду
 ангиотензина изм
 действия. Реабс

может быть блокирована не только (а возможно, и не столько) вследствие невозможности пополнения внутриклеточного пула активирующего кальция за счет притока извне, но и в силу подавления электрической активности, стимулирующей высвобождение кальция, связанного во внутриклеточных депо.

Наиболее вероятным представляется ныне комбинированный механизм, включающий как мобилизацию внутриклеточного кальция, так и приток его извне [320]. Считается, что быстрая, фазовая, компонента сокращения обусловлена мобилизацией внутриклеточного кальция, а медленная, тоническая, — поступлением кальция из наружного раствора [164]. Относительная величина каждого вклада для различных типов гладких мышц, по-видимому, неодинакова [125, 151].

Схематически возможные пути действия ангиотензина на динамику концентрации кальция в миоплазме могут быть учтены в рамках модели, описываемой следующей системой уравнений:

$$\frac{d[Ca]_m}{dt} = \gamma \Phi_0(t) - \Theta\{\Psi(t)\} ([Ca]_m - [Ca]_D) - (k_1 + k_3) [Ca]_m; \quad (4.3.1)$$

$$\frac{d[Ca]_D}{dt} = k_1 [Ca]_m - \Theta\{\Psi(t)\} ([Ca]_D - [Ca]_m) - k_2 [Ca]_D,$$

где γ — поверхность клетки, $[Ca]_m$, $[Ca]_D$ — концентрация Ca^{2+} в миоплазме и депо, соответственно; смысл констант скоростей ясен из рис. 4.7.

Приток в клетку наружного кальция описывается членом $\gamma \Phi_0$, причем, если полагать, что он обусловлен в основном потоками кальция, возникающими в процессе развития потенциала действия, его приближенно можно представить в виде некоторой периодической функции с частотой ν , зависящей от примененной дозы ангиотензина. Помимо этого, в соответствии с соображениями, обсуждавшимися в предыдущем разделе, следует считаться с изменением под влиянием ангиотензина формы волны потенциала действия. Реабсорбция кальция из мио-

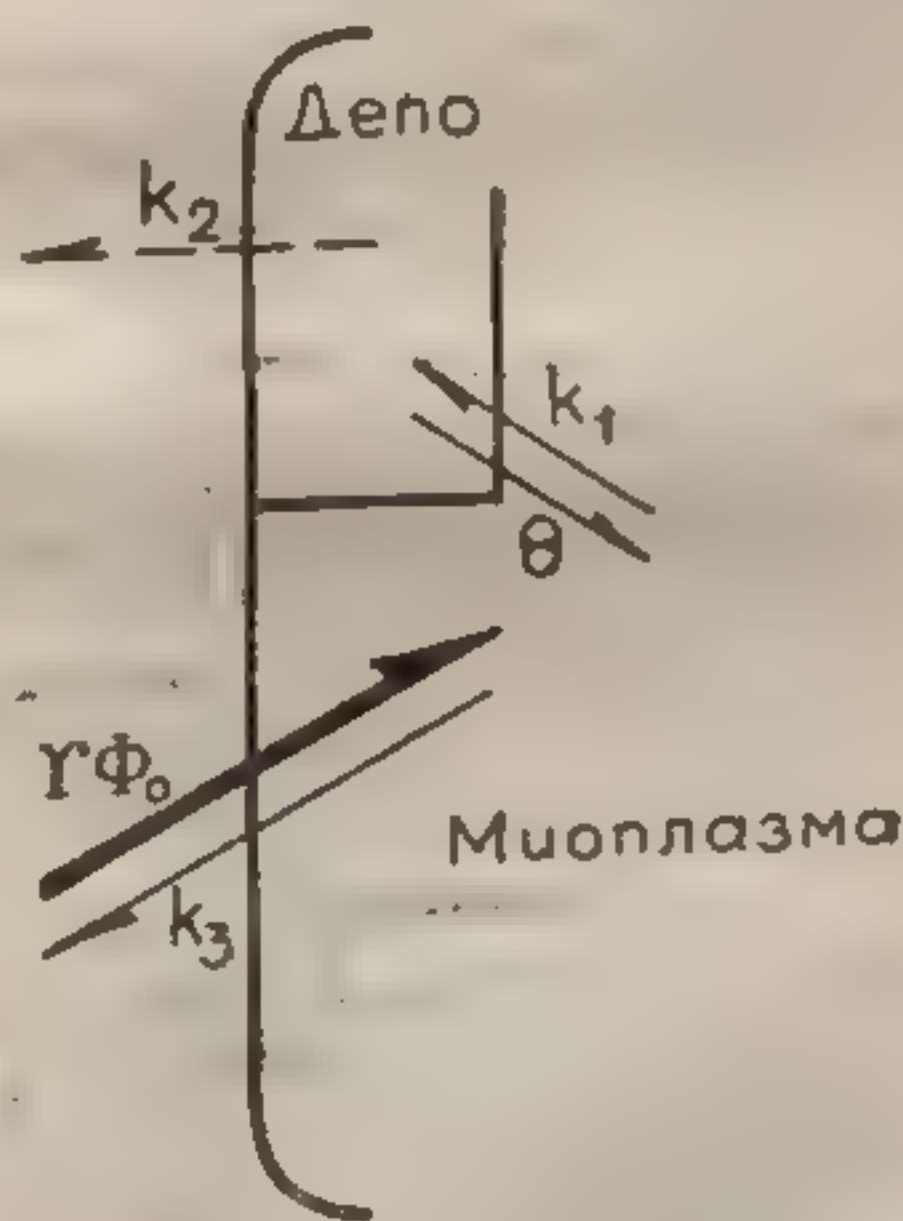


Рис. 4.7. Балансная модель динамики концентрации кальция в миоплазме гладкомышечной клетки.

плазмы описывается членом $k_1[Ca]_m$, выделение из депо в мио-плазму — членом $k_2[Ca]_d$.

По-видимому, кальциевое депо гладкомышечной клетки расположено в основном на внутренней поверхности мембраны [176], причем «кальциевая помпа» обеспечивает перенос ионов Ca^{2+} из миоплазмы в депо. Константа скорости k_2 выхода связанного кальция из депо и коэффициент Θ , регулирующий «активный» поток кальция из миоплазмы в депо, могут также оказываться элементами, «управляемыми» ангиотензином. Следует считать с двумя возможностями такого управления: опосредованным воздействием через деполяризацию клеточной мембраны или непосредственным влиянием на механизм активного транспорта. Упомянутые в разделе 4.1 данные об ингибирующем действии ангиотензина на кальциевую помпу мембранной фракции микросом, приводящем к выделению из нее кальция [96], указывают на возможность реализации второго пути миотропного эффекта ангиотензина. Возможно, он служит в известном смысле дополнением к рассмотренным выше механизмам, хотя не исключено также, что именно этот эффект является ключевым актом, вызывающим развитие сокращения. Важно отметить, что такое предположение, вообще говоря, не противоречит данным об увеличении под действием ангиотен-

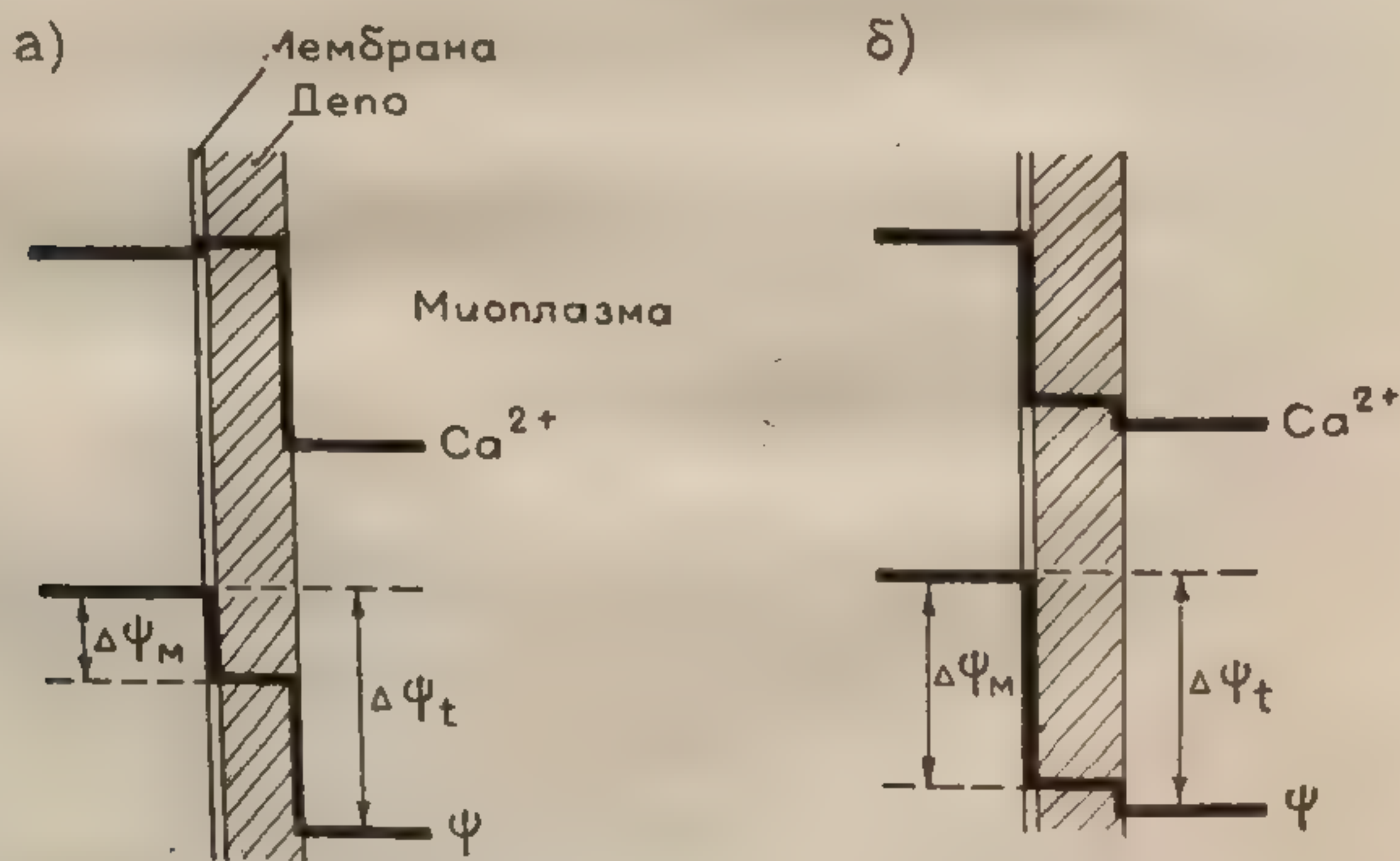


Рис. 4.8. Схематическое изображение концентрационного и электрического профиля мембраны до (а) и после (б) высвобождения кальция из депо.

Сократительная реакция мускулатуры под действием ангиотензина

зина входящих потоков кальция и частоты спайков. На рис. 4.8 схематически показано изменение концентрационного и электрического профиля мембраны после высвобождения кальция из депо под влиянием ангиотензина. Вследствие ингибирования кальциевого насоса, осуществляющего выведение Ca^{2+} из миоплазмы, резко падает концентрация этого иона в депо, после чего может измениться знак градиента концентраций на мембране и появиться входящий поток кальция. Перестройка концентрационного профиля приведет также к деполяризации возбудимых структур мембраны, что, в свою очередь, вызовет увеличение частоты спайков.

Количественная проверка соотношений (4.3.1) в наиболее общей форме в настоящее время затруднена из-за отсутствия достаточного количества необходимых экспериментальных оценок, однако некоторые частные случаи могут быть рассмотрены.

За исключением только что обсуждавшейся работы [96], какие-либо экспериментальные исследования действия ангиотензина на внутриклеточную динамику кальция отсутствуют. Таким образом, справедливость предпринятых выше рассуждений может проверяться лишь косвенным путем. Одним из возможных подходов является сопоставление электрической и механической реакций гладких мышц на ангиотензин.

Наиболее сложным для анализа и в то же время наименее изученным этапом развития сократительной реакции гладкой мышцы является ее заключительная фаза — активация сократительных структур ионами кальция. Прямые измерения, выполненные на изолированных сократительных структурах гладких мышц, дают лишь качественное описание зависимости степени сокращения от концентрации кальция [246]; можно предполагать, что аналогично тому, как это имеет место в случае поперечнополосатых мышц, при умеренных концентрациях кальция эта зависимость окажется близкой к линейной [171].

Таким образом, предметом рассмотрения оказывается в конце концов динамика концентрации кальция в миоплазме.

По оценке В. А. Бурого и М. Ф. Шубы [95], входящий поток кальция в течение развития единичной волны потенциала действия на клетке гладких мышц матки морской свинки повышает внутриклеточную концентрацию кальция на $1,2 \times 10^{-5}$ моль/л. Эта величина сравнима с предполагаемой пороговой концентрацией, индуцирующей развитие сокращения, — $2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л [168]. Соотношение вкладов «внеклеточного» и

«внутриклеточного» кальция у различных типов мышц может быть различным в зависимости, например, от относительного объема саркоплазматического ретикулума.

Какой из этих вкладов стимулируется ангиотензином?

Рассмотрим соответствующие двум предельным случаям модельные соотношения. Предположим вначале, что приток «внеклеточного» кальция весьма мал по сравнению с резервом, мобилизуемым из депо под влиянием деполяризации мембраны.

Система (4.3.1) может быть в этом приближении упрощена за счет исключения членов, описывающих «медленные» процессы обмена кальция между клеткой и окружением, и с учетом

$$[Ca]_M + [Ca]_D = C_0 = \text{const} \quad (4.3.2)$$

можно записать

$$\frac{d[Ca]_M}{dt} = \Theta\{\Psi(t)\} (C_0 - [Ca]_M) - k_1[Ca]_M. \quad (4.3.3)$$

Другой предельный случай — полное преобладание вклада «внеклеточного» кальция. Тогда приток кальция извне определится некоторой периодической функцией $v[\Psi(t), z]$ и для малых изменений C_0

$$\frac{d[Ca]_M}{dt} = v[\Psi(t), z] - k_1[Ca]_M. \quad (4.3.4)$$

Как упоминалось, ангиотензин вызывает увеличение длительности волны и потенциала действия сердечной мышцы кролика; соответственно увеличивается и амплитуда механической реакции $p(t)$. Форма зависимостей Θ и v , входящих в

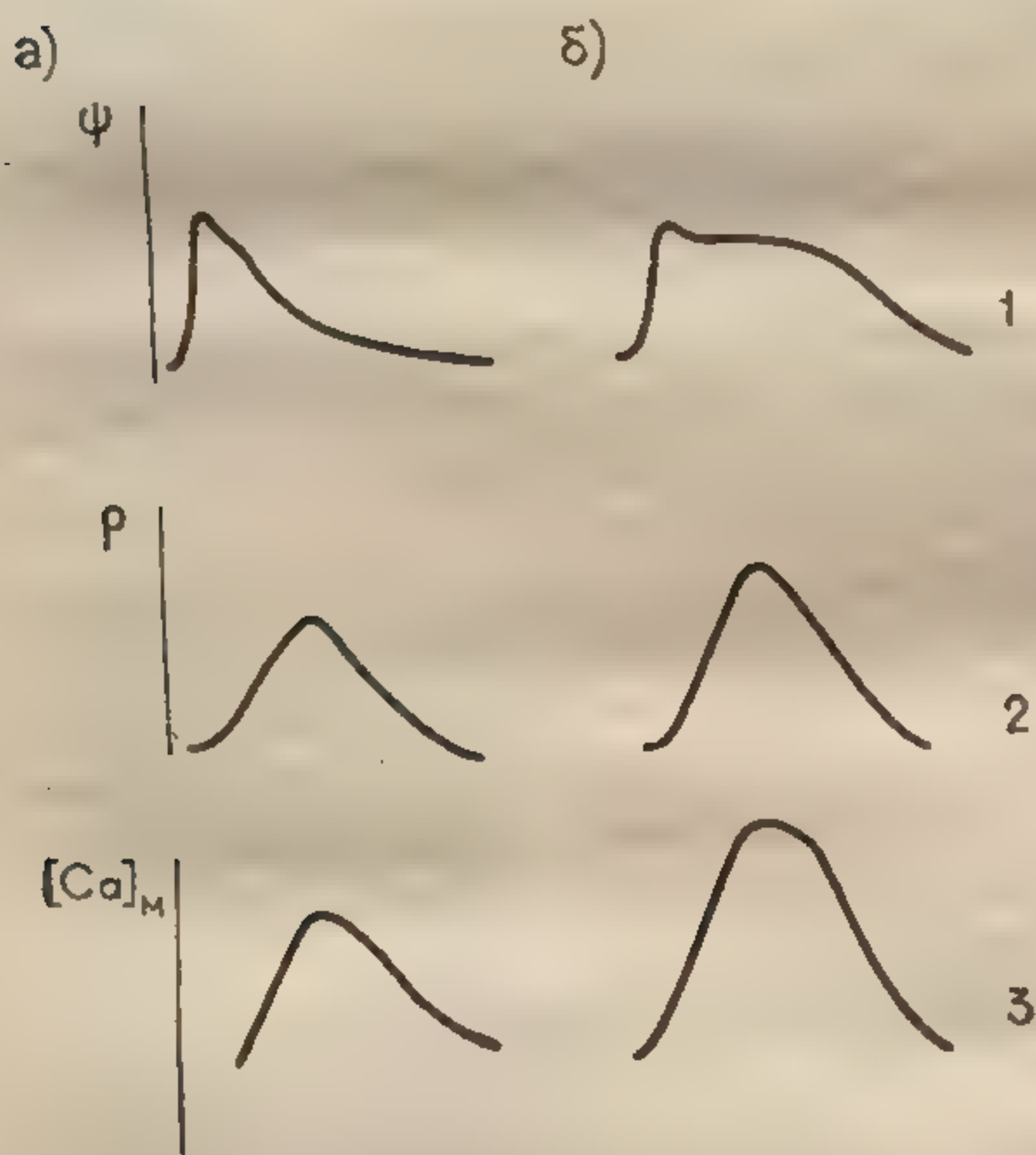


Рис. 4.9. Волна потенциала действия (1), соответствующие ей кривые сокращения (2) и динамики концентрации кальция в миоплазме (3) волокна мышцы предсердия кролика в контроле (а) и после обработки ангиотензином в концентрации 10^{-7} моль/л (б).

1, 2 — полученные экспериментально в [87], 3 — рассчитанные с помощью уравнения (4.3.3).

уравнения (4.3.3) и (4.3.4), неизвестна, однако ясно, что такой эффект будет иметь место для любой кривой Θ , ν переходного типа в случае обеих моделей. Проиллюстрируем это на примере модели первого типа, полагая

$$\Theta[\Psi(t)] \cong \kappa \Psi(t). \quad (4.3.5)$$

На рис. 4.9 экспериментальные данные работы [87] сопоставляются с зависимостью, определяемой соотношением (4.3.3).

Решение (4.3.3) в этом случае примет вид

$$[Ca]_M = C_0 \Theta A \exp[-k_1 - \Psi(t)] \cdot \int_0^t (e^{-\beta_1 t} - e^{-\beta_2 t}) \exp[k_1 t + \Psi(t)] dt, \quad (4.3.6)$$

где

$$\Psi(t) = A \left(\frac{e^{-\beta_2 t}}{\beta_2} - \frac{e^{-\beta_1 t}}{\beta_1} \right).$$

Увеличение длительности волны потенциала действия (достигаемое за счет уменьшения константы β_2 при сохранении ее амплитуды) вызывает увеличение амплитуды кривой, описывающей динамику концентрации кальция в миоплазме.

Представляя $\Psi(t)$ в виде регулярной последовательности спайков формы (4.3.6), можно с помощью соотношения (4.3.3) продемонстрировать другой эффект ангиотензина — увеличение частоты спайков. На рис. 4.10 расчетная функция $[Ca]_M(t)$ сопоставляется с данными работы [226]; действие ангиотензина на уровне $\Psi(t)$ моделировалось скачкообразным изменением частоты спайков.

Следует, однако, иметь в виду, что кривые рис. 4.9 и 4.10 построены с использованием весьма грубой модели исключительно с целью чисто качественного уяснения картины развивающихся процессов; разумеется, нет и речи о том, чтобы сдвигать обоснованный выбор между моделью (4.3.3), соответствующей мобилизации «внутреннего» кальция, и моделью (4.3.4), предполагающей поступление в миоплазму лишь внешнего кальция. Наконец, следует сделать несколько замечаний по поводу еще одного возможного механизма — непосредственного высвобождения кальция из депо под действием ангиотензина. На такую возможность указывают результаты упоминавшихся выше экспериментов с микросомальными фракциями плазматических

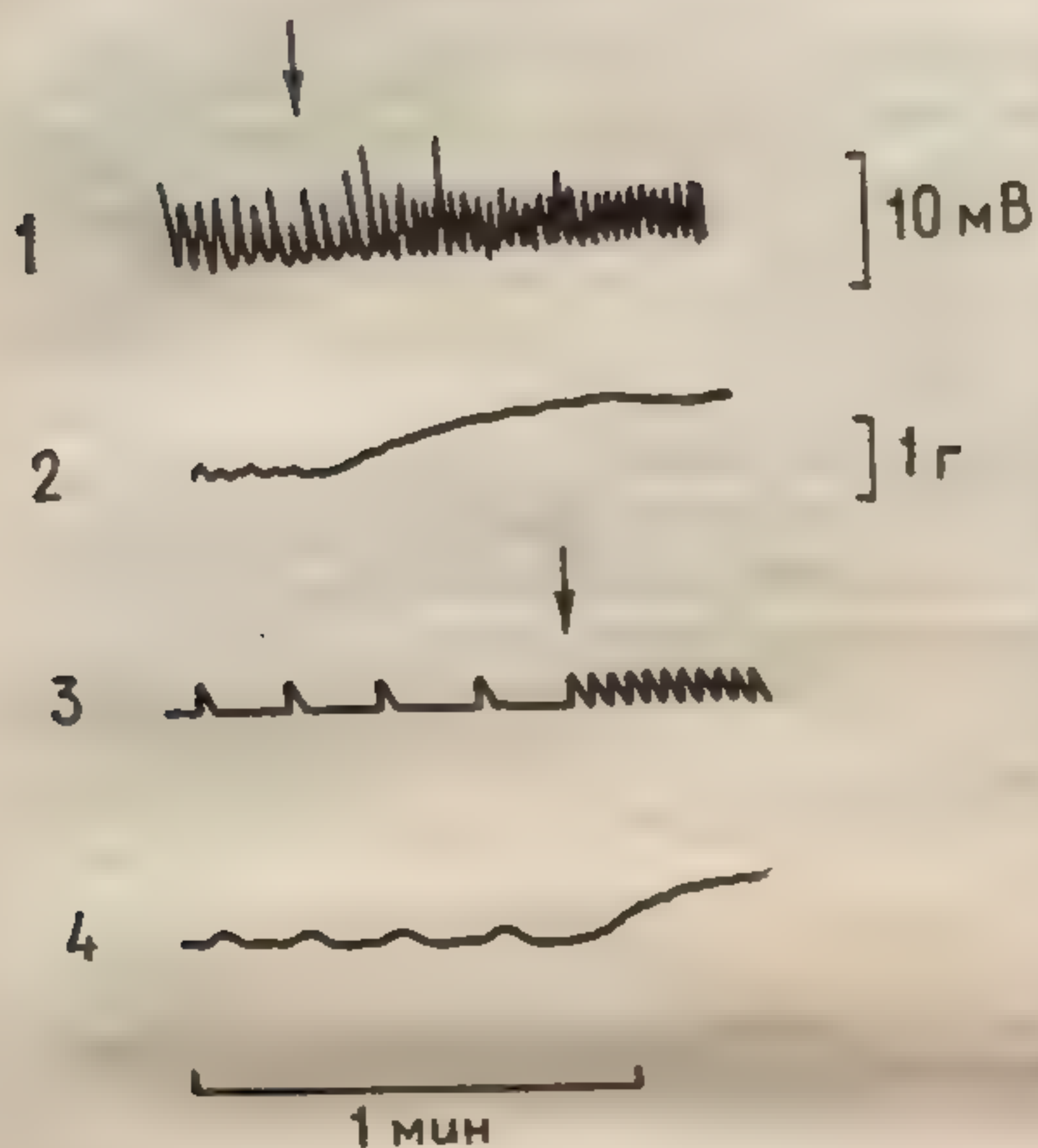


Рис. 4.10. Электрическая (1) и механическая (2) реакции ленты ободочной кишки морской свинки на ангиотензин [226]; модельная функция $\Psi(t)$ (3) и динамика $[Ca]_m$ (4), рассчитанная с помощью уравнения (4.3.4).

мембран клеток гладких мышц [96]; как отмечалось в предыдущем разделе, этот эффект может вызвать деполяризацию мембраны и увеличение частоты спайков. В этом случае установление нового стационарного уровня концентрации кальция в миоплазме оказалось бы зависимым от характера взаимодействий многих внутриклеточных механизмов, причем количественное описание этих взаимосвязей далеко выходит за рамки возможностей современной биофизики; назовем хотя бы наиболее неопределенный элемент — зависимость между степенью деполяризации мембраны и частотой спайков.

Качественные рассуждения позволяют утверждать, что и в этом случае вызы-

ваемые ангиотензином изменения электрической и механической активности имели бы характер, присущий зависимостям, представленным на рис. 4.10. То обстоятельство, что в некоторых случаях вызываемое ангиотензином увеличение частоты спайков не сопровождается заметным падением потенциала покоя (как это имеет место, например, в случае сердечной мышцы кролика [87]), не противоречит обсуждаемому механизму, поскольку при высвобождении кальция из «примембранного» депо деполяризации подвергается лишь собственно мембрана, а разность потенциалов между миоплазмой и внеклеточным раствором практически не изменяется.

Вполне вероятно, что дискуссия по проблемам, затронутым в настоящем разделе, несколько преждевременна; мы обсудили относящиеся сюда данные главным образом с целью продемонстрировать масштабы трудностей, стоящих на пути вполне

некоторые эмпири-

в настоящем разделе

на детальную

процесса сокращения

желанием переоси

значные и зачастую рас

«десенситизация»

и т. п. Эти понятия и

в «классической»

явно проявляясь в различ

интерпретации иных средств

Наконец, постоянно возн

зависимости сократительной

регулируемого в экспериме

концентрация Ca^{2+} . Именно эт

Гурвич и Суриа [179], пред

модель сокращения гладкой

$[Ca]_0 + \gamma$

$[Ca]_a$

где γ — «активировани

связывания кальция н

$[Ca]_0$ и $[Ca]_a$ — свобо

ный кальций и кальци

депо, соответствующи

рами и

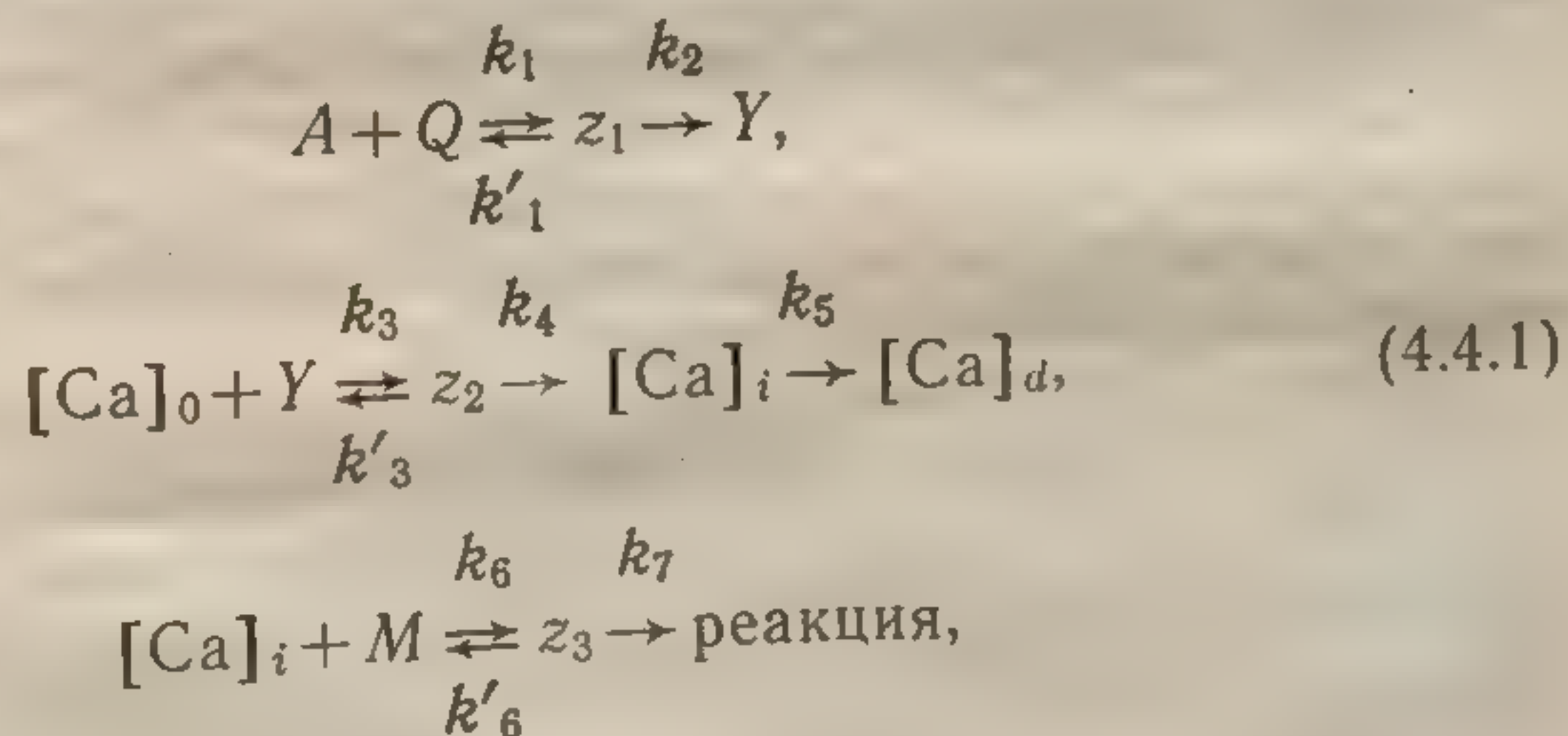
Сократительная реакция мускулатуры под действием ангиотензина

осмысленной трактовки последовательности событий, развивающихся в гладкомышечной клетке, подвергшейся действию ангиотензина.

4.4. НЕКОТОРЫЕ ЭМПИРИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ СОКРАЩЕНИЯ

В настоящем разделе будут рассмотрены подходы, не претендующие на детальную трактовку физико-химических механизмов процесса сокращения; их использование обусловлено, скорее, желанием перевести на полук количественный язык неоднозначные и зачастую расплывчатые термины типа «тахифилаксия», «десенситизация», «парадоксальная фаза», «спад» (fade) и т. п. Эти понятия и соответствующие им эффекты отсутствуют в «классической» оккупационной теории, но, постоянно проявляясь в различных экспериментах, требуют для интерпретации иных средств помимо чисто вербальных.

Наконец, постоянно возникает необходимость исследования зависимости сократительной реакции от столь важного (и легко регулируемого в эксперименте) фактора, как наружная концентрация Ca^{2+} . Именно эту цель преследовали прежде всего Гурвиц и Суриа [179], предложившие следующую упрощенную модель сокращения гладкой мышцы:



где Y — «активированные» кальциевые каналы; M — центры связывания кальция на сократительных структурах; $[\text{Ca}]_i$, $[\text{Ca}]_0$ и $[\text{Ca}]_d$ — свободный внутриклеточный кальций, наружный кальций и кальций, находящийся в цитоплазматическом депо, соответственно; z_2 и z_3 — комплексы кальция с ионофорами и центрами связывания сократительных структур.

Существует, таким образом, ряд элементов сходства между этой моделью и рассмотренной выше системой, описываемой уравнениями (4.3.1).

Стационарная зависимость сократительной реакции описывается выражением

$$\rho = k_2 k_4 k_7 [Ca]_0 Q M_0 C / \left[k_5 \frac{k'_1}{k_1} \frac{k'_6}{k_6} \left(\frac{k'_3}{k_3} + [Ca]_0 \right) + \left(k_5 \frac{k'_6}{k_6} \frac{k'_3}{k_3} + k_5 \frac{k'_6}{k_6} [Ca]_0 + k_4 k_2 C_0 Q \right) \right], \quad (4.4.2)$$

причем величина ρ оказывается гиперболически зависящей не только от C , но и от $[Ca]_0$; именно такую зависимость наблюдали на опыте авторы работы [179]. Впоследствии модель Гурвица и Сурия в несколько модифицированном виде использовалась в работах [99, 100] для интерпретации результатов экспериментов, в которых исследовалось влияние наружного кальция на сократительную реакцию гладкой мускулатуры, вызываемую аналогами ацетилхолина.

С другой стороны, модель Гурвица и Сурия не может объяснить кинетику развития миотропного эффекта. Типичный пример семейства кинетических кривых, соответствующих различным концентрациям ангиотензина, приводился ранее (см. рис. 2.13); аналогичные зависимости наблюдались и для ряда других контракторных агентов [100, 237]. По мере увеличения концентрации монотонная кривая $\rho(t)$ превращается в переходную с выраженным максимумом; этот эффект отсутствует в системе, описываемой схемой (4.4.1).

Для его объяснения были предложены две модели. Схема, развитая Пэйтоном [236, 238], предполагает, что фактором, инициирующим сократительную реакцию, является не количество образовавшихся комплексов «агонист—рецептор», а частота их образования. В результате этого вместо зависимости

$$\rho \equiv \rho(z), \quad (4.4.3)$$

используемой в «классической» оккупационной теории, вводится постулат

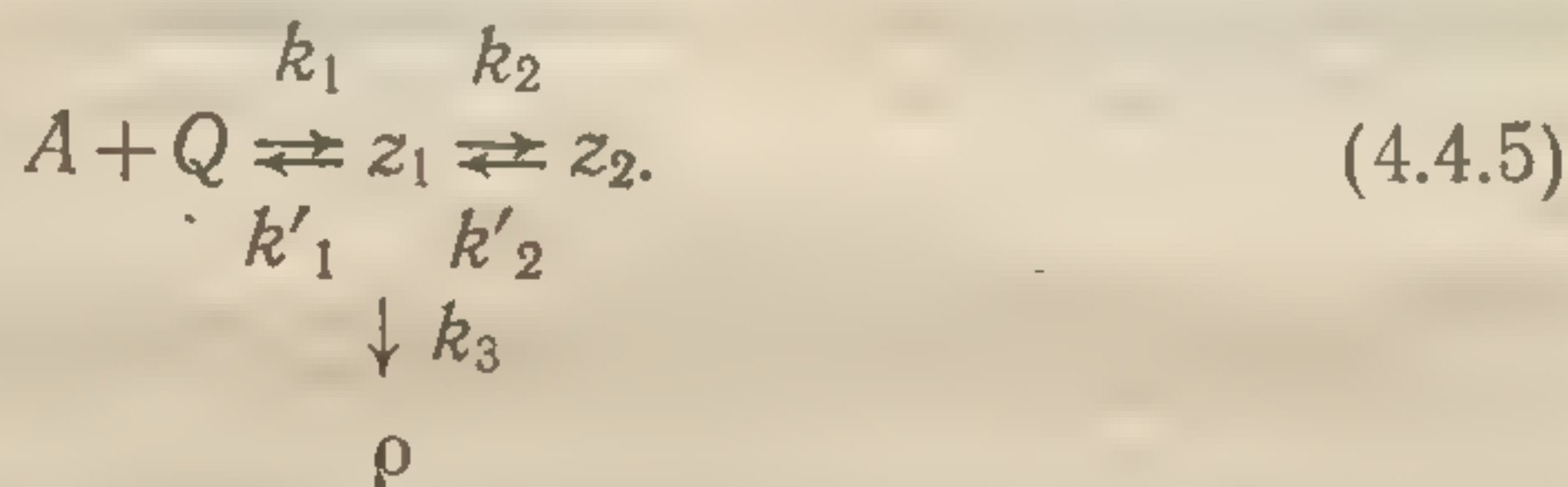
$$\rho \equiv \rho[k_1(Q - z)C]. \quad (4.4.4)$$

При включении зависимости (4.4.4) вместо (4.4.3) в «модель

Сократительная реакция мускулатуры под действием ангиотензина

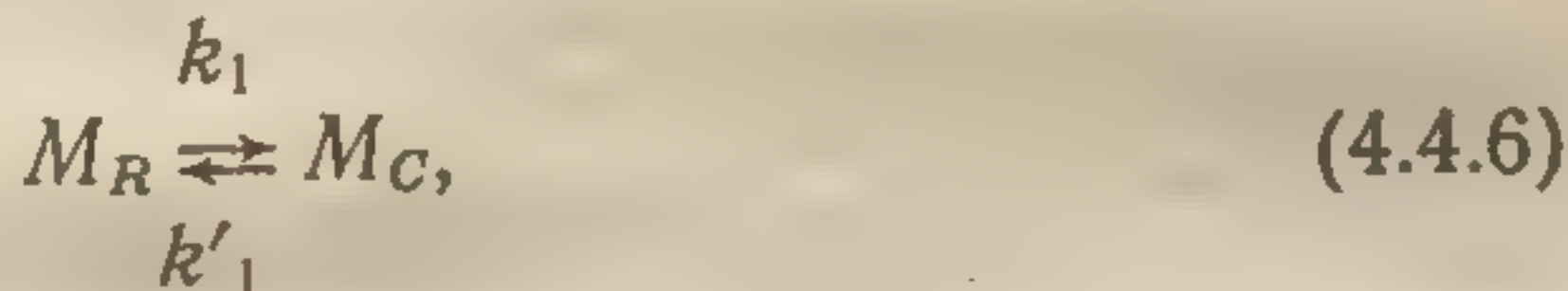
биофазы» соответствующие кривые $\rho(t)$ действительно приобретают переходную форму, однако никаких других доказательств в пользу этой гипотезы получено не было.

Другая модель, предложенная Уилбэром с соавт. [331] для объяснения переходной формы зависимости $\rho(t)$ при высоких концентрациях агониста, предполагает, что гормон-рецепторный комплекс может пребывать в двух состояниях, причем реакция пропорциональна числу комплексов первого типа в следующей схеме:



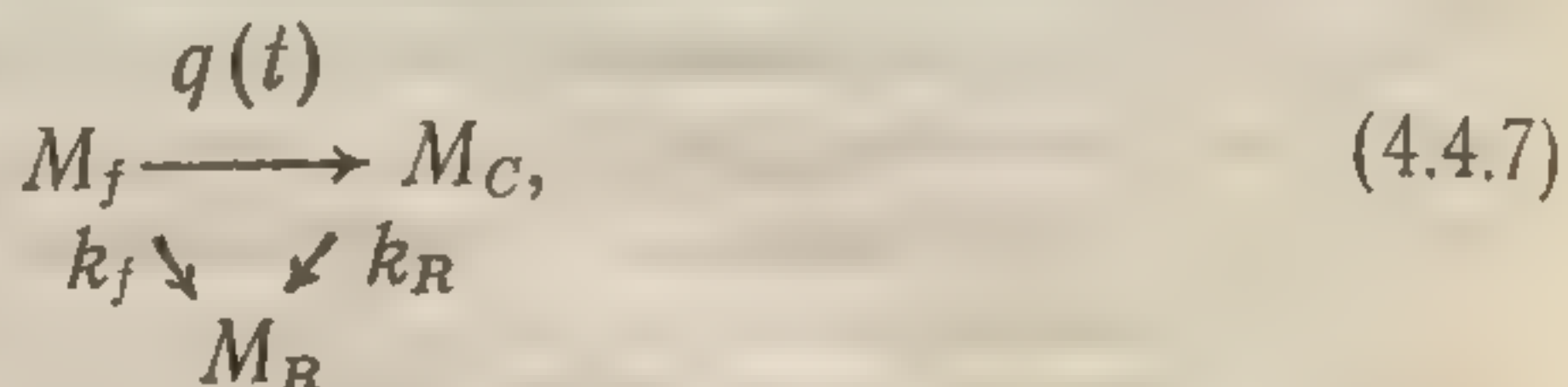
И в этом случае также отсутствуют прямые доводы в пользу существования такого механизма, выглядевшего маловероятным и с точки зрения более общих представлений рецепторной теории.

Однако в формальном отношении модель (4.4.5) близка весьма правдоподобной гипотезе, согласно которой переходная форма кривых $\rho(t)$ есть результат неких явлений истощения. В интересующем нас случае удобная иллюстрация этой идеи может быть получена на основе представлений, сформулированных в свое время Фурхтготтом [154, 155], который предложил рассматривать степень сокращения мышцы как стационарный уровень динамического равновесия в системе



где M_C и M_R суть сокращенные и покоящиеся сократительные элементы клетки. Всякое стимулирующее воздействие вызывает в конечном счете увеличение константы k_1 , сдвигая равновесие вправо. С другой стороны, следует считаться с тем обстоятельством, что всякий релаксировавший элемент нуждается в некотором периоде покоя, прежде чем он окажется опять способным к сокращению. Это означает, что общий пул элементов, находящихся в состоянии релаксации, может быть разделен на две части — готовых M_f и не готовых к немедленному

сокращению M_R . В результате общая схема процесса может быть представлена в виде



причем временная зависимость коэффициента $q(t)$ в конечном счете определяется промежуточными стадиями развития реакции. Например, можно предположить [179], что q пропорционально количеству кальция, связанного сократительными белками:

$$q = \kappa [\text{Ca}] [M]. \quad (4.4.8)$$

В этом случае, согласно ранее рассмотренным моделям, функция $q(t)$ окажется возрастающей (очевидно, в общем случае это следует понимать как возрастание в среднем за промежуток времени, существенно больший интервал между двумя спайками).

В еще более упрощенном представлении q может быть принято пропорциональным количеству комплексов «гормон—рецептор»:

$$q(C, t) = \kappa z = \frac{\kappa Q C k_1}{k'_1 + k_1 C} \{1 - \exp[-(k'_1 + k_1 C)t]\}. \quad (4.4.9)$$

Решение системы

$$\begin{aligned} \frac{dM_C}{dt} &= q(t) M_f - k_R M_C; \\ \frac{dM_f}{dt} &= k_f (M_0 - M_f - M_C) - q(t) M_f, \end{aligned} \quad (4.4.10)$$

описывающей динамическое поведение только что рассмотренной модели, в общем случае не может быть получено в форме квадратур; очевидно, однако, что при малых концентрациях агониста $q \ll k_R, k_f$ и развитие реакции будет осуществляться симбатно $q(t)$, т. е. кривая $p(t)$ окажется монотонно возрастающей. При больших концентрациях агониста $q \gg k_R, k_f$, так что коэффициент q может рассматриваться как асимптотически постоянный:

$$q \equiv q^{\max} \quad (4.4.11)$$

Сократительная реакция мускулатуры под действием ангиотензина

и система легко интегрируется:

$$M_c = D - Ae^{-\beta_1 t} - Be^{-\beta_2 t}, \quad (4.4.12)$$

где

$$\beta = \frac{1}{2} [q + k_R + k_f \pm \sqrt{(k_R + k_f - q)^2 - 4k_R k_f}] ;$$

$$D = \frac{q k_f M_0}{q k_R + q k_f + k_R k_f} ;$$

$$A = \frac{\beta_2 D - q M_0}{\beta_2 - \beta_1}, \quad B = \frac{q M_0 - \beta_1 D}{\beta_2 - \beta_1}.$$

На рис. 4.11 семейство кривых $\rho(t, C)$, полученных численным интегрированием системы (4.4.12) (коэффициент $q(t)$ задавался в форме (4.4.9)), приведено в сопоставлении с экспериментально найденными зависимостями временного развития сократительной реакции восходящей ободочной кишки крысы на различные концентрации ангиотензина. Кривые, соответствующие концентрациям 10^{-9} и 10^{-8} моль/л, аппроксимировались уравнением (4.4.12); таким же образом были получены оценки констант k_R , k_f , κ . Значения k_1 , k'_1 для того же тест-объекта приводились ранее (см. табл. 2.6).

Отметим, что эффекты истощения как причина появления фазы спада на временных зависимостях развития сократительной реакции вовсе не обязательно должны связываться именно с рассмотренным механизмом.

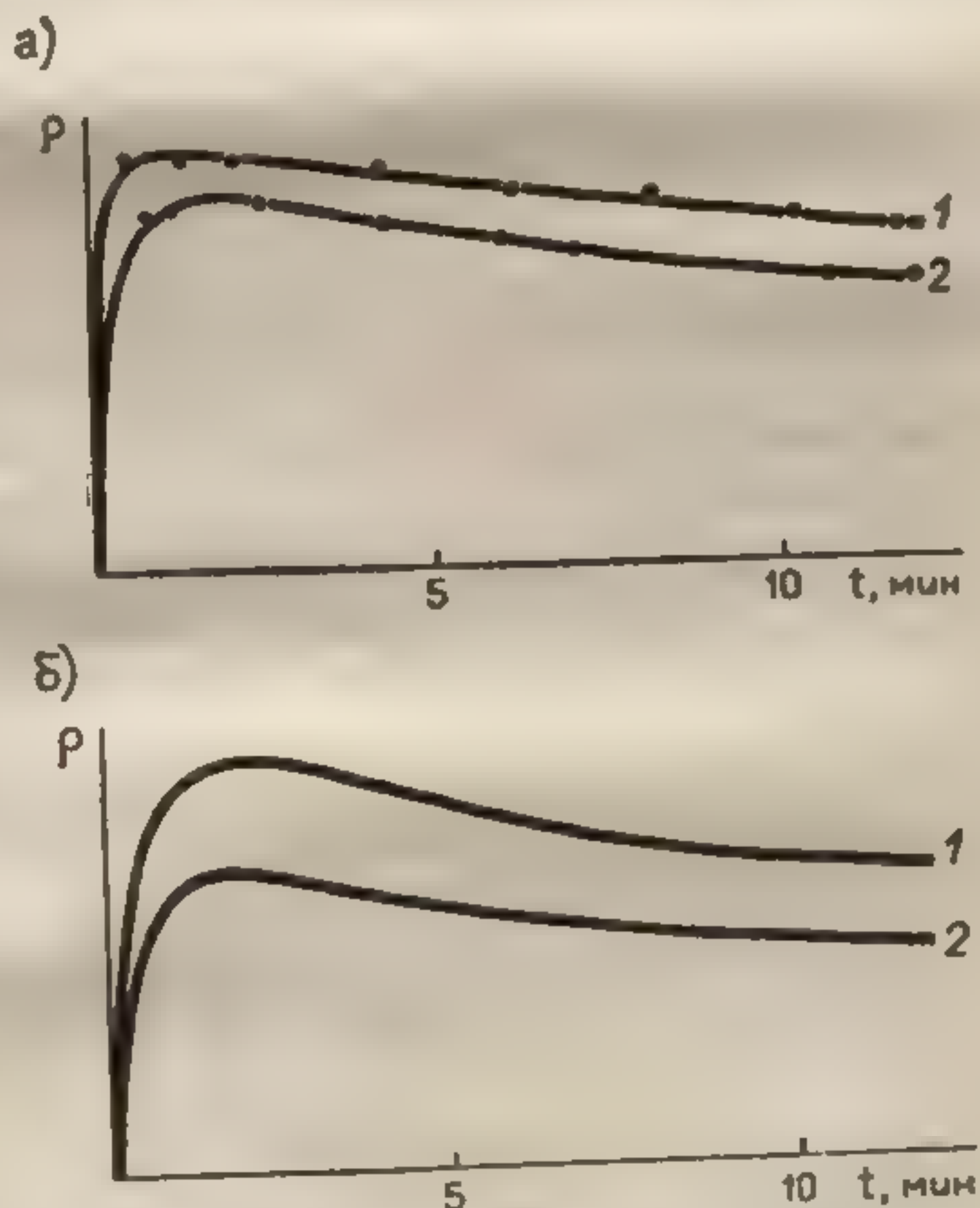


Рис. 4.11. Семейство кинетических кривых $\rho(t)$, соответствующих различным концентрациям ангиотензина: а — полученные экспериментально на восходящей ободочной кишке крысы, б — рассчитанные с помощью (4.4.10). 1 — $C = 10^{-8}$ моль/л, 2 — $C = 10^{-9}$ моль/л.

Уравнения, формально совпадающие с (4.4.10) или весьма близкие к ним, могут быть записаны и для модели, повторяющей только что приведенные рассуждения применительно не к внутриклеточным сократительным элементам, а к целым клеткам; с другой стороны, в рамках гипотезы о действии ангиотензина исключительно посредством высвобождения внутриклеточного кальция система уравнений, описывающих динамику связанного сократительными структурами Ca^{2+} , окажется весьма сходной с (4.4.10).

Приведенные рассуждения и оценки указывают, таким образом, лишь возможные формальные причины, определяющие характер зависимости $\rho(t)$; отнесение анализируемых эффектов к определенному этапу развития сократительной реакции требует более детальных исследований, в частности на уровне надклеточных процессов.

1. Абашева Г. К.,
дель динамики
В кн.: Перехо
с. 106—108.
2. Ахрем А. А.,
турно-функцион
II. К вопросу
гамма-аминома
хим., 1978, №
3. Вегнер Р. Э.
сина и некото
учен. степени
4. Вегнер Р. Э.,
гиотензина II
5. Вегнер Р. Э.,
ангиотензина
пептид аргин
449.
6. Вихерт А. М.
ствия ангиот
7. Галактионов
кул. — В к
А. И. Китай
1970, с. 8—1
8. Галактионов
диалектическ
тур. — Инж
9. Галактионов
сложных м
240 с.
10. Галактионов
конф.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абашева Г. К., Михнёва Л. М., Станишевская Л. Б. Математическая модель динамики кортикостерона при импульсном воздействии АКТГ. — В кн.: Переходные процессы в биологических системах. М., 1977, с. 106—108.
2. Ахрем А. А., Голубович В. П., Галактионов С. Г. Исследование структурно-функциональных отношений в ряду гамма-аминомасляной кислоты. II. К вопросу о пространственных аспектах взаимодействия молекулы гамма-аминомасляной кислоты с рецептором. — Изв. АН БССР. Сер. хим., 1978, № 5, с. 5—8.
3. Вегнер Р. Э. Синтез и исследование гибридов ангиотензина—вазопрессина и некоторых «общих» фрагментов пептидов. Автореф. дис. на соиск. учен. степени канд. хим. наук. Рига, 1973. 34 с.
4. Вегнер Р. Э., Чипенс Г. И. Синтез [1-аспарагин, 3-пролин, 5-валин]-ангиотензина II. — Журн. общ. химии, 1972, т. 42, с. 2334—2341.
5. Вегнер Р. Э., Чипенс Г. И. Синтез [1-глицинамид, 2-карбонил-аргинин]-ангиотензина II, аналога ангиотензина II, содержащего С-концевой дипептид аргинин-вазопрессина. — Журн. общ. химии, 1975, т. 45, с. 444—449.
6. Вихерт А. М., Ушкалов А. Ф. Различные аспекты физиологического действия ангиотензина. — Кардиология, 1971, т. 11, с. 143—156.
7. Галактионов С. Г. Описание пространственной структуры сложных молекул. — В кн.: Конформационные расчеты сложных молекул. Под ред. А. И. Китайгородского, Т. Л. Перельмана. Минск, ИТМО АН БССР, 1970, с. 8—19.
8. Галактионов С. Г., Никифорович Г. В. К вопросу о выборе значения диалектической постоянной для расчетов сложных молекулярных структур. — Инж.-физ. журнал, 1971, т. 20, с. 200—205.
9. Галактионов С. Г., Никифорович Г. В., Перельман Т. Л. Диффузия в сложных молекулярных структурах. Минск, Наука и техника, 1974. 240 с.
10. Галактионов С. Г., Никифорович Г. В., Шерман С. А. Теоретический конформационный анализ молекулы глутатиона. — В кн.: Пластидный аппарат и жизнедеятельность растений. Под ред. М. Н. Гончарика. Минск, Наука и техника, 1971, с. 138—145.

Список литературы

11. Громов Э. П., Плетнев В. З., Попов Е. М. Теоретический конформационный анализ антаманда. II. Структуры с внутримолекулярными водородными связями. — Биоорганическая химия, 1976, т. 2, с. 19—27.
12. Гуревич М. И., Берштейн С. А. Гладкие мышцы сосудов и сосудистый тонус. Киев, Наукова думка, 1974. 183 с.
13. Дашевский В. Г. Конформации органических молекул. М., Химия, 1974. 432 с.
14. Исследование конформационной подвижности дипептидных единиц 20 аминокислотных остатков. — Изв. АН БССР. Сер. хим. наук, 1976, № 5, с. 83—92. Авт.: А. А. Ахрем, В. П. Голубович, С. Г. Галактионов, Г. В. Никифорович, М. Д. Шендерович, С. А. Шерман.
15. К расчету ближних внутримолекулярных взаимодействий в полимерах. — Инж.-физ. журнал, 1974, т. 26, с. 1098—1104. Авт.: С. Г. Галактионов, Т. Л. Перельман, К. А. Розина, В. М. Цейтин.
16. Кирнарский Л. И., Никифорович Г. В. О функциональной роли конформационно «жестких» и «лабильных» фрагментов молекул пептидных гормонов. — Тезисы докладов I республиканской конференции молодых ученых-химиков. Таллин, АН ЭССР, 1975, с. 138—139.
17. Китайгородский А. И. О расчете конформаций молекул и их упаковки с помощью схемы атом—атом потенциалов. — Высокомолекулярные соединения, 1968, т. А10, с. 2669—2671.
18. Комиссаров И. В. Элементы теории рецепторов в молекулярной фармакологии. М., Медицина, 1969. 216 с.
19. Конформации аминокислотных остатков, предшествующих пролину в полипептидной цепи. — Доклады АН БССР, 1977, т. 21, с. 38—41. Авт.: А. А. Ахрем, В. П. Голубович, Л. И. Кирнарский, Г. В. Никифорович, С. А. Шерман, М. Д. Шендерович, С. Г. Галактионов, В. М. Цейтин.
20. Конформационные состояния молекулы брадикинина в растворе. Расчет стабильных конформаций. — Биоорганическая химия, 1977, т. 3, с. 1190—1197. Авт.: С. Г. Галактионов, С. А. Шерман, М. Д. Шендерович, Г. В. Никифорович, В. И. Леонова.
21. Леонова В. И., Никифорович Г. В. Теоретический конформационный анализ тетрапептида Ас-цис-про-лей-гли-NH₂. — Теоретическая и экспериментальная химия, 1977, т. 13, с. 692—696.
22. Леонова В. И., Никифорович Г. В., Галактионов С. Г. Теоретический конформационный анализ пептидного остова циклической части молекулы окситоцина. — Изв. АН БССР. Сер. биол., 1976, № 3, с. 115—117.
23. Марков Х. М. Патологическая физиология артериальной гипертензии. София, Медицина и физкультура, 1970, с. 85—147.
24. Математическое моделирование переходных процессов артериального давления при действии вазоактивных веществ. — В кн.: Переходные процессы в биологических системах. М., Наука, 1977, с. 112—115. Авт.: В. Я. Гельман, А. Д. Долгушина, Г. Н. Ильюткин, Е. В. Майстрах, В. И. Тарабукин.
25. Міхнева Л. М., Галакцієнау С. Г. Аб аценці біялагчай актыунасці некоторых гармонау. — Весці АН БССР. Сер. біял. навук, 1970, с. 57—61.
26. Никифорович Г. В., Галактионов С. Г. Корреляция конформаций остат-

Список литературы

- ков α -спирали поли-L-аланина. — Доклады АН БССР, 1971, т. 15, с. 430—432.
27. Никифорович Г. В., Шендерович М. Д., Галактионов С. Г. Теоретический конформационный анализ молекулы ангиотензина. — Биоорганическая химия, 1976, т. 2, с. 1268—1270.
 28. Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Шкроб А. М. Мембраноактивные комплексоны. М., Наука, 1976. 538 с.
 29. Орлов Р. С. Физиология гладкой мускулатуры. М., Медицина, 1967. 256 с.
 30. Павар А. П., Ауна З. П., Чипенс Г. И. Синтез [2-глицин; 5-валил]-ангиотензина II и некоторых его производных. — Журн. общ. химии, 1971, т. 41, с. 1859—1863.
 31. Павар А. П., Чипенс Г. И. Синтез фрагментов ангиотензина II ■ его глицинсодержащих аналогов. — Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 1970, с. 121—122.
 32. Павар А. П., Чипенс Г. И. Синтез [Asn¹, Gly², Val⁵]-ангиотензина II. — Изв. АН ЛатвССР. Сер. хим., 1970, с. 250—251.
 33. Подход к расчету стабильных конформаций олигопептидов. II. Олигопептиды с чередующимися остатками пролина ■ фенилаланина. — Биоорганическая химия, 1976, т. 2, с. 28—42. Авт.: П. Н. Мельников, Н. А. Ахмедов, Г. М. Липкинд, Е. М. Попов.
 34. Попов Е. М. Подход к априорному расчету стабильных конформаций белковых молекул. — Молекулярная биология, 1975, т. 9, с. 578—582.
 35. Попов Е. М., Ахмедов Н. А., Липкинд Г. М. Подход к расчету стабильных конформаций олигопептидов. I. Ди- и трипептиды с остатками аланина и фенилаланина. — Биоорганическая химия, 1975, т. 1, с. 1268—1279.
 36. Пространственная структура молекулы люлиберина. — Тезисы докладов IV Всесоюзного симпозиума по химии белков и пептидов. Минск, 1977, с. 137. Авт.: А. А. Ахрем, Л. И. Кирнарский, В. П. Голубович, С. Г. Галактионов.
 37. Расчет стабильных конформаций молекулы люлиберина. — Биоорганическая химия, 1978, т. 5, с. 838—840. Авт.: А. А. Ахрем, В. П. Голубович, Л. И. Кирнарский, С. Г. Галактионов.
 38. Романовская И. К., Чипенс Г. И. Твердофазный синтез [1-(β -аспарагиновая кислота), 5-валин]-ангиотензина II. — Журн. общ. химии, 1971, т. 41, с. 1856—1857.
 39. Скоков А. А. Стандартные программы решения задач математического программирования, вып. 10. М., Изд-во МГУ, 1969. 32 с.
 40. Синтез и свойства [4-глицин]- и [7-глицин]-ангиотензинов II. — Журн. общ. химии, 1975, т. 45, с. 1632—1639. Авт.: А. П. Павар, И. А. Бите, Г. Я. Авотинь, Г. И. Чипенс.
 41. Система согласованных эффективных центральных потенциалов для описания межмолекулярных взаимодействий. — В кн.: Исследование плазмохимических процессов ■ плазменных устройств. Под ред. О. И. Ясько. Минск, ИТМО АН БССР, 1975, с. 118—128. Авт.: К. А. Розина, М. Д. Шендерович, Г. В. Никифорович, С. А. Шерман, С. Г. Галактионов.

Список литературы

42. Теоретический конформационный анализ брадикининпотенцирующего пептида. I. — Биоорганическая химия, 1977, т. 3, с. 335—347. Авт.: С. Ф. Архипова, Н. Н. Севастьянова, Г. М. Липкинд, Е. М. Попов.
43. Теоретический конформационный анализ брадикининпотенцирующего пептида. II. — Биоорганическая химия, 1977, т. 3, с. 473—484. Авт.: Н. Н. Севастьянова, Г. М. Липкинд, С. Ф. Архипова, Е. М. Попов.
44. Теоретический конформационный анализ молекулы тиреолиберина. — Тезисы докладов IV Всесоюзного симпозиума по химии белков и пептидов. Минск, 1977, с. 138. Авт.: А. А. Ахрем, В. П. Голубович, Л. И. Кирнарский, М. А. Родионов.
45. Теоретическое исследование конформаций метиламидов N-ацетилглицина, N-ацетил-L-аланина, N-ацетил-L-валина и N-ацетил-L-пролина. — Молекулярная биология, 1968, т. 2, с. 622—630. Авт.: Е. М. Попов, Г. М. Липкинд, С. Ф. Архипова, В. Г. Дашевский.
46. Уразаева З. В., Дубилей П. В. О некоторых аспектах барьерной функции легких по отношению к ряду вазоактивных веществ. — Успехи совр. биол., 1977, т. 83, с. 139—155.
47. Ходоров Б. И. Общая физиология возбудимых мембран. М., Наука, 1975. 406 с.
48. Чизмаджев Ю. А., Маркин В. С. О распространении возбуждения в одной модели нервного волокна. — Биофизика, 1967, т. 12, с. 900—907.
49. Чипенс Г. И. Синтез и исследование структурно-функциональной организации пептидных гормонов. — Изв. АН ЛатвССР, 1975, № 6, с. 57—67.
50. Чипенс Г. И. Современные направления в исследовании клеточных рецепторов пептидных и белковых гормонов. — Тезисы докладов IV Всесоюзного симпозиума по химии белков и пептидов. Минск, 1977, с. 7.
51. Шерман С. А. Расчет пространственных структур олигопептидных фрагментов белков и биологических пептидов. Дис. на соиск. учен. степени канд. физ.-мат. наук. Минск, 1978. 105 с.
52. Шрёдер Э., Любке К. Пептиды. Т. II. М., Мир., 1969, с. 29.
53. Эрлих П. Биологические этюды. СПб., Изд. Т-ва «Новое в медицине», 1911, с. 8—9.
54. Юрин В. М., Гончарик М. Н., Галактионов С. Г. Перенос ионов через мембраны растительных клеток. Минск, Наука и техника, 1977. 159 с.
55. Юрин В. М., Иванченко В. М., Галактионов С. Г. Регуляция функций мембран растительных клеток. Минск, Наука и техника (в печати).
56. A comparison of the effects of angiotensin II analogues on several tissues. — J. Physiol., 1975, vol. 246, p. 109P—110P. Auth.: P. C. Gregory, K. A. Munday, B. J. Parsons, J. A. Poit.
57. A proposed conformation of isoleucyl⁵-angiotensin II. — Biochim. biophys. acta, 1962, vol. 58, p. 550—557. Auth.: R. R. Smeby, K. Arakawa, F. M. Bumpus, M. M. Marsh.
58. Agonist and antagonist relationships in 1- and 8-substituted analogs of angiotensin II. — J. Med. Chem., 1974, vol. 17, p. 1156—1160. Auth.: M. C. Khosla, M. M. Hall, R. R. Smeby, F. M. Bumpus.
59. Amino acid composition of hypertensin II and its biochemical relationship

Список литературы

- to hypertension. — *J. Exp. Med.*, 1956, vol. 104, p. 183—191. Auth.: K. E. Lentz, L. T. Skeggs, K. R. Woods, J. R. Kahn, N. P. Shumway.
60. Analogs of angiotensin II. Solid phase synthesis. — *J. Med. Chem.*, 1970, vol. 13, p. 177—181. Auth.: N. C. Chaturvedi, W. K. Park, R. R. Smeby, F. M. Bumpus.
 61. *Anderson N. C., Ramon F., Snyder S.* Studies on calcium and sodium in uterine smooth muscle excitation under current-damp and voltage-damp conditions. — *J. Gen. Physiol.*, 1971, vol. 58, p. 322—339.
 62. *Andersson B., Eriksson L., Oltner R.* Further evidence for angiotensin-sodium interaction in central control of fluid balance. — *Life Sci.*, 1970, vol. 9, p. 1091—1096.
 63. *Andreatta R., Hofmann K.* Studies on polypeptides. XLI. The synthesis of [5-valine, 6- β -(pyrazolyl-3)-alanine]-angiotensin II, a potent hypertensive peptide. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, vol. 90, p. 7334—7338.
 64. *Andreatta R. H., Scheraga H. A.* Synthesis of [5-valine, 7-N-methylalanine]-angiotensin II, a hypertensive peptide. — *J. Med. Chem.*, 1971, vol. 14, p. 489—492.
 65. *Angiotensin. Hand. Exp. Pharm.*, vol. 37. Ed. by I. H. Page, F. M. Bumpus. N. Y., Springer-Verlag, 1974. 528 p.
 66. Angiotensin II analogs. I. Synthesis and biological evaluation of [Gly¹, Gly², Ile⁵]-angiotensin II, [Ac-Gly¹, Gly², Ile⁵]-angiotensin II, and [Gly¹, Gly², Ile⁵, His(Bzl)⁶]-angiotensin II. — *J. Med. Chem.*, 1969, vol. 12, p. 733—737. Auth.: E. C. Jorgensen, G. C. Windridge, W. Patton, T. C. Lee.
 67. Angiotensin II analogs. VI. Stereochemical factors in the 5 position influencing pressor activity. 1. — *J. Med. Chem.*, 1971, vol. 14, p. 899—903. Auth.: E. C. Jorgensen, S. R. Rapaka, G. C. Windridge, T. C. Lee.
 68. Angiotensin II analogs. VII. Stereochemical factors in the 5 position influencing pressor activity. 2. — *J. Med. Chem.*, 1971, vol. 14, p. 904—906. Auth.: E. C. Jorgensen, S. R. Rapaka, G. C. Windridge, T. C. Lee.
 69. Angiotensin II analogs. XI. Further studies on des-aspartyl-angiotensin II. — *J. Med. Chem.*, 1974, vol. 17, p. 323—326. Auth.: E. C. Jorgensen, I. C. Kiraly-Olah, T. C. Lee, G. C. Windridge.
 70. Angiotensin II binding to zona glomerulosa cells from rabbit adrenal glands. — *Biochem. Pharmacol.*, 1976, vol. 25, p. 1031—1034. Auth.: S. Gurchinoff, P. A. Khairallah, M.-A. Devynck, P. Meyer.
 71. Angiotensin II conformations. Infrared and raman studies. — *Eur. J. Biochem.*, 1972, vol. 28, pp. 174—182. Auth.: S. Femandjian, P. Fromageot, A.-M. Tistchenko, J. P. Leicknam, M. Lutz.
 72. Angiotensin increases microsomal (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in several tissues. — *Biochim. biophys. acta*, 1972, vol. 273, p. 401—405. Auth.: Y. Gutman, Y. Shamir, D. Glushevitzky, S. Hochman.
 73. Angiotensin II receptors and aldosterone production in rat adrenal glomerulosa cell. — *Endocrinology*, 1978, vol. 102, p. 685—696. Auth.: J. Douglas, G. Aguilera, K. Kondo, K. Catt.
 74. Angiotensin receptors in smooth muscle cell membranes. — *Nature. New Biol.*, 1973, vol. 245, p. 55—58. Auth.: M.-A. Devynck, M.-G. Pernollet, P. Meyer, S. Femandjian, P. Fromageot.

Список литературы

75. Angiotensin receptors in rat uterine membranes. — FEBS Lett., 1975, vol. 55, p. 168—172. Auth.: B. Rouzaire-Dubois, M.-A. Devynck, E. Chevillotte, P. Meyer.
76. Angiotensinase with a high degree of specificity in plasma and red cells. — Science, 1963, vol. 140, p. 672—674. Auth.: P. A. Khairallah, F. M. Bumpus, I. H. Page, R. R. Smeby.
77. Angiotensin-like and antagonist activities of N-terminal modified [8-leucine]-angiotensin II peptides. — J. Med. Chem., 1974, vol. 17, p. 238—241. Auth.: T. B. Paiva, G. Goissis, L. Juliano, M. E. Miyamoto, A. C. M. Paiva.
78. Arakawa K., Bumpus F. M. An improved synthesis of isoleucine⁵-angiotensin octapeptide. — J. Am. Chem. Soc., 1961, vol. 83, p. 728—732.
79. Arakawa K., Smeby R. R., Bumpus F. M. Synthesis of succinyl¹-isoleucyl⁵-angiotensin II and N-(poly-O-acetylseryl)-isoleucyl⁵-angiotensin II. — J. Am. Chem. Soc., 1962, vol. 84, p. 1424—1426.
80. Barfield M., Gearhart H. L. The conformational dependence of vicinal ¹⁵N—C—C—H coupling constants in peptides. — Mol. Phys., 1974, vol. 27, p. 899—902.
81. Baudouin M., Meyer P., Worcel M. Specific binding of ³H-angiotensin in rabbit aorta. — Biochem. Biophys. Res. Comm., 1971, vol. 42, p. 434—440.
82. Beeler G. W., Reuter H. The relation between membrane potential, membrane currents and activation of contraction in ventricular myocardial fibers. — J. Physiol., 1970, vol. 207, p. 211—229.
83. Bennet I. P., Snyder S. H. Angiotensin II binding to mammalian brain membranes. — J. Biol. Chem., 1976, vol. 251, p. 7423—7430.
84. Bleich H. E., Galardy R. E., Printz M. P. Conformation of angiotensin II in aqueous solution. Evidence for the γ-turn model. — J. Am. Chem. Soc., 1973, vol. 95, p. 2041—2042.
85. Blockade and stimulation of renal, adrenal and vascular angiotensin II receptors with 1-Sar, 8-Ala angiotensin II in normal man. — J. Clin. Invest., 1976, vol. 57, pp. 39—46. Auth.: N. K. Hollenberg, G. H. Williams, B. Burger, I. Ishikawa, D. F. Adams.
86. Blockade of renin or angiotensin for understanding human hypertension: ■ comparison of propranolol, saralasin and converting enzyme blockade. — Fed. Proc., 1977, vol. 36, p. 1781—1787. Auth.: J. H. Laragh, D. B. Case, J. M. Wallace, H. Keim.
87. Bonnardeaux J. L., Regoli D. Action of angiotensin and analogues on the heart. — Can. J. Physiol. Pharmacol., 1974, vol. 52, p. 50—60.
88. Bravo E. L., Khosla M. C., Bumpus F. M. Vascular and adrenocortical responses to specific antagonist of angiotensin II. — Am. J. Physiol., 1975, vol. 228, p. 110—114.
89. Bravo E. L., Khosla M. C., Bumpus F. M. Differential effects of Asp¹-angiotensin II and Sar¹-angiotensin II on vascular and adrenal receptors in the dog. — Clin. Sci. Mol. Med., 1976, vol. 51, p. 41—45.
90. Brecher P. I., Pyun H. Y., Chobanian A. V. Studies on the angiotensin II receptor in the zona glomerulosa of the rat adrenal gland. — Endocrinology, 1974, vol. 95, p. 1026—1033.

Список литературы

91. Brewster A. I. R., Hruby V. J. 300-MHz NMR study of oxytocin in aqueous solution: conformational implications. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, vol. 70, p. 3806—3809.
92. Bumpus F. M., Schwarz H., Page I. H. Synthesis and properties of angiotonin. — *Circulation*, 1957, vol. 17, p. 664—667.
93. Burgen A. S. V., Roberts G. C. K., Feeney J. Binding of flexible ligands to macromolecules. — *Nature*, 1975, vol. 253, p. 753—755.
94. Burgess A. W., Momany F. A., Scheraga H. A. Conformational analysis of thyrotropin releasing factor. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, vol. 70, p. 1456—1460.
95. Bury V. A., Shuba M. F. Transmembrane ionic currents in smooth muscle of ureter during excitation. — In: *Physiology of smooth muscle*. Ed. by E. Bülbring, M. F. Shuba. N. Y., Raven Press, 1976, p. 65—75.
96. Calcium release induced by interaction of angiotensin with its receptors in smooth muscle cell microsomes. — *Nature*, 1972, vol. 235, p. 336—338. Auth.: M. Baudouin, P. Meyer, S. Femandjian, J.-L. Morgat.
97. Campbell W. B., Pettinger W. A. Organ specificity of angiotensin II and des-aspartyl angiotensin II in the conscious rat. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1976, vol. 198, p. 450—456.
98. Cessi C., Bettini V. Sull'interazione K^+ -angiotensino nello stomaco isolato e denervato di rato. — *Boll. Soc. ital. biol. sper.*, 1974, vol. 50, p. 1231—1234.
99. Chang K. J., Triggle D. J. Quantitative aspects of drug-receptor interactions. I. Ca^{++} and cholinergic receptor activation in smooth muscle: a basic model for drug-receptor interactions. — *J. Theor. Biol.*, 1973, vol. 40, p. 125—154.
100. Chang K. J., Triggle D. J. Quantitative aspects of drug-receptor interactions. II. The role of $Ca^{2+}_{mem.}$ in desensitization and spasmolytic activity. — *J. Theor. Biol.*, 1973, vol. 40, p. 155—172.
101. Changeaux J.-P., Podleski T., Meunier J.-C. On some structural analogies between acetylcholinesterase and the macromolecular receptors of acetylcholine. — *J. Gen. Physiol.*, 1969, vol. 54, p. 225—244.
102. Circular dichroism spectra of truncated and other analogs of angiotensin II. — *Eur. J. Biochem.*, 1976, vol. 61, p. 297—305. Auth.: D. Greff, S. Femandjian, P. Fromageot, M. C. Khosla, R. R. Smeby, F. M. Bumpus.
103. Competitive binding activity of angiotensin II analogues in an adrenal cortex radioligand-receptor assay. — *Endocrinology*, 1975, vol. 97, p. 275—282. Auth.: S. Saltman, A. Baukal, S. Waters, F. M. Bumpus, K. J. Catt.
104. Conformation-function relationship of angiotensin II and analogs. — In: *Peptides-1976*. Ed. by A. Loffet. Bruxelles, 1976, p. 514—525. Auth.: S. Femandjian, K. Lintner, W. Haar, P. Fromageot, M. C. Khosla, R. R. Smeby, F. M. Bumpus.
105. Conformational flexibility of angiotensin II. A carbon-13 spin-lattice relaxation study. — *Biochemistry*, 1975, vol. 14, p. 878—886. Auth.: R. Deslauriers, A. C. M. Paiva, K. Schaumburg, J. C. P. Smith.
106. Conformational studies of angiotensin peptides in aqueous solution by PMR. — *Biochemistry*, 1973, vol. 12, p. 4950—4957. Auth.: H. E. Bleich, R. E. Galardy, M. P. Printz, L. C. Craig.

Список литературы

107. Craig L. C., Harfenist E. J., Palladini A. C. Dialysis studies. VII. The behavior of angiotensin, oxytocin, vasopressin and some of their analogs. — *Biochemistry*, 1964, vol. 3, p. 764—769.
108. Cresswell M. A., Hanson R. W., Law H. D. The synthesis and properties of analogues of angiotensin modified in the 1- or the 4-position. — *J. Chem. Soc. Ser. C*, 1967, p. 2669—2673.
109. Crystallisation of angiotensinamide II. — *FEBS Lett.*, 1971, vol. 16, p. 192—194. Auth.: S. Fermandjian, J.-L. Morgat, P. Fromageot, C. Legres-sus, P. Maire.
110. Cuatrecasas P., Hollenberg M. D. Membrane receptors and hormone action. — *Adv. Prot. Chem.*, 1976, vol. 30, p. 261—451.
111. Damiani A., De Santis P., Pizzi A. Allowed conformations of alanyl preceding prolyl residues. — *Nature*, 1970, vol. 226, p. 542—543.
112. Daniel E. E. Effect of sympathomimetic amines and angiotensin on active ion transport in smooth muscles. — *Arch. int. pharmacodyn.*, 1965, vol. 158, p. 131—138.
113. D'Auriac A. G. 3',5'-cyclic AMP phosphodiesterases in cytosol of uterine smooth muscle; effect of angiotensin. — *Life Sci.*, 1973, vol. 12, pt 2, p. 233—239.
114. D'Auriac A. G. Effect of angiotensin II on the level of cyclic AMP in uterus. — *Clin. Sci. Mol. Med.*, 1973, vol. 45, p. 247—249.
115. D'Auriac A. G., Baudouin M., Meyer P. Mechanism of action of angio-tensin in smooth muscle cell. — *Circ. Res.*, 1972, vol. 31, p. 151—160.
116. De Coen J.-L., Humble H. C., Koch M. H. J. Theoretical conformational analysis of Met-enkefalin. — *FEBS Lett.*, 1977, vol. 73, p. 38—42.
117. De Coen J.-L., Ralston E. Theoretical conformational analysis of Asn¹, Val⁵-angiotensin II. — *Biopolymers*, 1977, vol. 16, p. 1929—1943.
118. De Robertis E., Fiszer de Plajas S. Isolation of hydrophobic binding neuro-transmitter amino acids. γ -Aminobutyric acid receptor of the shrimp muscle. — *J. Neurochem.*, 1974, vol. 23, p. 1121—1125.
119. De Robertis E., Fiszer de Plajas S., Ochoa E. Adrenergic receptors. Isolation and molecular properties. — *Acta cytoparmacol.*, 1974, N 2, p. 5—21.
120. De Robertis E., Schacht J. Neurochemistry of cholinergic receptors. N. Y., North-Holland Publ. Co., 1974. 146 p.
121. Démonstration de récepteurs spécifiques de l'angiotensine III dans les surrénales de rat. — *C. r. Acad. sci.*, 1977, vol. D284, p. 1293—1296. Auth.: M.-A. Devynck, M.-G. Pernollet, P. G. Matthews, P. Meyer.
122. Deodhar S. D. Immunologic production of antiangiotensin I. Preparation of angiotensin-protein complex antigen. — *J. Exp. Med.*, 1960, vol. 111, p. 419—427.
123. Deslauriers R., Smith J. C. P., Walter R. Conformational mobility of the pyrrolidine ring of proline in peptides and peptide hormones as manifest in carbon-13 spin-lattice relaxation times. — *J. Biol. Chem.*, 1974, vol. 249, p. 7006—7010.
124. Deslauriers R., Walter R., Smith J. C. P. ¹³C-NMR resonance studies of the conformation of the X-Pro bond in the oligopeptide hormones, TRH,

Список литературы

- LH-RF, angiotensin and MSH release-inhibiting factor. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1973, vol. 53, p. 244—250.
125. *Deth R., van Breeman C.* Relative contribution of Ca^{2+} influx and cellular Ca^{2+} release during drug-induced activation of rabbit aorta. — *Pflügers' Arch.*, 1974, Bd. 348, S. 13—22.
 126. *Deth R., van Breeman C.* Agonist induced release of intracellular Ca^{++} in the rabbit aorta. — *J. Membr. Biol.*, 1977, vol. 30, p. 363—380.
 127. *Devynck M.-A., Meyer P.* Angiotensin II receptors in smooth muscle — a biochemical approach. — *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 1975, Suppl. 2, p. 93—97.
 128. *Devynck M.-A., Meyer P.* Angiotensin receptors in vascular tissues. — *Am. J. Med.*, 1976, vol. 61, p. 758—767.
 129. *Devynck M.-A., Meyer P.* Angiotensin receptors. — *Biochem. Pharmacol.*, 1978, vol. 27, p. 1—5.
 130. Die Synthese eines hochwirksamen Hypertensin II-amids. — *Helv. chim. acta*, 1957, vol. 40, p. 614—624. Auth.: W. Rittel, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker, R. Schwyzer.
 131. Dielectric properties of alkyl amides. II. Liquid dielectric constant and loss. — *J. Phys. Chem.*, 1964, vol. 68, p. 509—515. Auth.: S. J. Bass, W. I. Nathan, R. M. Meighan, R. H. Cole.
 132. Discussion of angiotensin II receptor mechanisms in smooth muscle. — *Res. Steroids*, 1975, vol. 6, p. 223—232. Auth.: M.-A. Devynck, F. Fyhrquist, M. Legros-Baudouin, P. Meyer, M. Worcel.
 133. Distribution of angiotensin II receptors in rat brain. — *Brain Res.*, 1977, vol. 122, p. 299—312. Auth.: N. E. Sirett, A. S. McLean, J. J. Bray, J. I. Hubbard.
 134. *Douglas J., Catt K. J.* Angiotensin II receptors in the rat adrenal cortex: effects of dietary electrolyte changes. — *J. Clin. Invest.*, 1976, vol. 58, p. 834—839.
 135. *Droogmans G., Casteels R.* Membrane potential and ion transport in smooth muscle cells. — In: *Physiology of smooth muscle*. Ed. by E. Bülbbring, M. F. Shuba. N. Y., Raven Press, 1976, p. 11—18.
 136. *Dun N. J., Nishi S., Karczmar A. G.* An analysis of the effect of angiotensin II on mammalian ganglion cells. — *J. Mol. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1978, vol. 204, p. 669—675.
 137. *Edman K. A. P., Schild H. O.* The need for calcium in the contractile responses induced by acetylcholine and potassium in the rat uterus. — *J. Physiol.*, 1962, vol. 161, p. 424—441.
 138. *Elliott D. F., Peart W. S.* The amino acid sequence in a hypertensin. — *Biochem. J.*, 1957, vol. 65, p. 246—253.
 139. Enhancement of the activity of angiotensin II by certain cations. — *Mol. Pharmacol.*, 1974, vol. 10, p. 57—67. Auth.: G. Schaechtelin, R. Walter, H. Salomon, J. Jelinek, P. Karen, J. H. Cort.
 140. Enkefalin: structure-function relationship. — *FEBS Lett.*, 1978, vol. 86, p. 239—242. Auth.: Yu. Yu. Balodis, G. V. Nikiforovich, I. V. Grinsteine, R. E. Vegner, G. I. Chipens.
 141. *Erdős E. G.* Conversion of angiotensin I to angiotensin II. — *Am. J. Med.*, 1976, vol. 60, p. 749—759.

Список литературы

142. Erdős E. G. The angiotensin I converting enzyme. — Fed. Proc., 1977, vol. 36, p. 1760—1765.
143. Evidence that des-Asp¹-angiotensin II mediates the renin-angiotensin response. — Circ. Res., 1976, vol. 38, Suppl. 2, p. 93—103. Auth.: R. H. Freeman, J. O. Davis, T. E. Lohmeier, W. S. Spielman.
144. Factors that influence the antagonistic properties of angiotensin II antagonists. — J. Med. Chem., 1973, vol. 16, p. 829—832. Auth.: M. C. Khosla, M. M. Hall, R. R. Smeby, F. M. Bumpus.
145. Femandjian S., Morgat J.-L., Fromageot P. Studies of angiotensin II conformations by circular dichroism. — Eur. J. Biochem., 1971, vol. 24, p. 252—258.
146. Ferreira A. T., Hampe O. G., Paiva A. C. M. The conformation of angiotensin II in aqueous solution. II. Dialysis and gel filtration behavior of [Asp¹, Val⁵]-angiotensin II. — Biochemistry, 1969, vol. 8, p. 3483—3487.
147. Forget G., Hiesler S. Preparation and characterization of adrenocortical plasma membrane angiotensin II receptors. — Can. J. Physiol. Pharmacol., 1976, vol. 54, p. 698—707.
148. Franze de Fernandez M. T., Delius A. E., Palladini A. C. Influence of pH on the conformation of angiotensin II and analog peptides. — Biochim. biophys. acta, 1968, vol. 154, p. 223—225.
149. Freeman R. H., Davies J. O., Lohmeier T. E. Des-1-Asp-angiotensin II. Possible internal role in homeostasis in the dog. — Circ. Res., 1975, vol. 37, p. 30—34.
150. Freer R. J. Evidence for two different mechanisms for angiotensin II-induced contractions of rat uterus. — Fed. Proc., 1974, vol. 33, p. 547—555.
151. Freer R. J. Calcium and angiotensin tachyphylaxis in rat uterus smooth muscle. — Am. J. Physiol., 1975, vol. 228, p. 1423—1430.
152. Freer R. J., Stewart J. M. Synthesis and pharmacology of position 6 analogs of AT II. — J. Med. Chem., 1973, vol. 16, p. 733—735.
153. Friedman S. M., Friedman C. L. The emerging role of sodium and potassium in the regulation of vascular smooth muscle tension. — In: Electrolytes and cardiovascular diseases. Ed. by E. Bajusz. Basel, S. Karger, 1965, p. 323—341.
154. Furchgott R. F. The pharmacology of vascular smooth muscle. — Pharmacol. Rev., 1955, vol. 7, p. 183—265.
155. Furchgott R. F. The use of β -haloalkylamines in the differentiation of receptors and in determination of dissociation constants of receptor-agonist complexes. — Adv. Drug Res., 1966, vol. 3, p. 21—55.
156. Gagnon D., Park W. K., Regoli D. Specific antagonist for the myotropic action of angiotensin II and angiotensin I on the isolated rat colon. — Brit. J. Pharmacol., 1971, vol. 43, p. 409—410.
157. Ganong W. F. The renin-angiotensin system and the central nervous system. — Fed. Proc., 1977, vol. 36, p. 1771—1775.
158. Glickson J. D., Cunningham W. D., Marshall G. R. Proton magnetic resonance study of angiotensin II (Asn¹, Val⁵) in aqueous solution. — Biochemistry, 1973, vol. 12, p. 3684—3692.

159. Glickson J. D. study of angiotensin II saturation spectra. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 120—125.

160. Glossman J. Adrenal cortex and angiotensin II. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 120—125.

161. Glossman J. Receptors in the adrenal cortex. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 120—125.

162. Glossman J. Angiotensin II receptors in the adrenal cortex. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 120—125.

163. Goldblatt H. J. The role of angiotensin II in the regulation of blood pressure. — J. Biol. Chem., 1954, vol. 205, p. 1—10.

164. Golenbock P. T. M. F. Smooth muscle and angiotensin II. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 120—125.

165. Goodfriend T. Angiotensin II receptors. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 120—125.

166. Goodfriend T. Angiotensin II receptors. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 120—125.

167. Goodfriend T. Angiotensin II receptors. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 120—125.

168. Goodfriend T. Angiotensin II receptors. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 120—125.

169. Green G. J. Biochemistry of angiotensin II. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 120—125.

170. Gross J. R. Angiotensin II receptors. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 120—125.

171. Grunwaldt J. Physiological and pharmacological aspects of angiotensin II. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 120—125.

172. Haber E. Angiotensin II receptors. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 120—125.

173. Haman J. L. Angiotensin II receptors. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 120—125.

174. Haman J. L. Angiotensin II receptors. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 120—125.

175. Heslop H. Angiotensin II receptors. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 120—125.

Список литературы

159. *Glickson J. D., Dadok J., Marshall G. R.* Proton magnetic double-resonance study of angiotensin II (Asn¹, Val⁵) in aqueous solution employing correlation spectroscopy. Assignment of peptide NH resonances and transfer of saturation from water. — *Biochemistry*, 1974, vol. 13, p. 11—14.
160. *Glossman H., Baukal A., Catt K. J.* Angiotensin II receptors in bovine adrenal cortex. Modification of angiotensin II binding by guanyl nucleotides. — *J. Biol. Chem.*, 1974, vol. 249, p. 664—666.
161. *Glossman H., Baukal A. T., Catt K. J.* Properties of angiotensin II receptors in the bovine and rat adrenal cortex. — *J. Biol. Chem.*, 1974, vol. 249, p. 825—834.
162. *Glossman H., Baukal A., Catt K. J.* Cation dependence of high-angiotensin II binding to adrenal cortex receptors. — *Science*, 1974, vol. 185, p. 281—283.
163. *Goldblatt H.* Renal origin of hypertension. — *Physiol. Rev.*, 1947, vol. 27, p. 120—165.
164. *Golenhoten K.* Theory of P and T systems for calcium activation of smooth muscle. — In: *Physiology of smooth muscle*. Ed. by E. Bülbring, M. F. Shuba. N. Y., Raven Press, 1976, p. 197—208.
165. *Goodford P. J.* The calcium content of the smooth muscle of guinea-pig taenia coli. — *J. Physiol.*, 1967, vol. 192, p. 145—157.
166. *Goodfriend T.* Angiotensin auto-potential. — *Brit. J. Pharmacol.*, 1970, vol. 40, p. 542P—543P.
167. *Goodfriend T. L., Lin S.-Y.* Receptors for angiotensin I and II. — *Circ. Res.*, 1970, vol. 26—27, Suppl. 1, p. 163—170.
168. *Goodfriend T. L., Peach M. J.* Angiotensin III: (des-aspartic-acid-1)-angiotensin II. Evidence and speculation for its role as an important agonist in the renin-angiotensin system. — *Circ. Res.*, 1975, vol. 36, p. 38—48.
169. *Green A. A., Bumpus F. M.* The purification of hog renin substrate. — *J. Biol. Chem.*, 1954, vol. 210, p. 281—286.
170. *Gross F., Turrian H.* Pharmacology of hypertensin and synthetic analogues. — In: *Polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels*. Ed. by M. Schachter. Oxford, 1960, p. 137—151.
171. *Grundfest H.* The role of calcium in excitation-contraction coupling. — In: *Physiology of smooth muscle*. Ed. by E. Bülbring, M. F. Shuba. N. Y., Raven Press, 1976, p. 163—173.
172. *Haber E., Page L. B., Jacoby G. A.* Synthesis of antigenic branch-chain copolymers of angiotensin and poly-L-lysine. — *Biochemistry*, 1965, vol. 4, p. 693—698.
173. *Hamon G., Worcel M.* Mechanism of excitation of uterine smooth muscle. Changes in ionic fluxes induced by angiotensin. — *J. Physiol.*, 1973, vol. 232, p. 99P—100P.
174. *Hamon G., Worcel M.* Mechanism of action of angiotensin II on the membrane potential of rat myometrium. — *Brit. J. Pharmacol.*, 1977, vol. 59, p. 497P.
175. *Hess H. J., Constantine J. W.* D-aspartyl¹-valyl¹-phenylalanine⁸ amide angiotensin II. — *J. Med. Chem.*, 1964, vol. 7, p. 602—606.

Список литературы

176. Heumann H.-G. The subcellular localization of Ca^{++} in vertebrate smooth muscle. — *Cell Tissue Res.*, 1976, vol. 169, p. 221—231.
177. Hopfinger A. J. Polymer-solvent interactions for homopolypeptides in aqueous solution. — *Macromolecules*, 1971, vol. 4, p. 731—737.
178. Hurwitz L., Hubbard W., Little S. The relationship between the drug-receptors interaction and calcium transport in smooth muscle. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1972, vol. 183, p. 117—126.
179. Hurwitz L., Suria A. The link between agonist action and response in smooth muscle. — *Ann. Rev. Pharmacol.*, 1971, vol. 11, p. 303—326.
180. Hydrogen-deuterium exchange of angiotensin II in trifluoroethanol. — *FEBS Lett.*, 1975, vol. 58, p. 273—276. Auth.: E. Navedryk-Viala, C. Thiéry, P. Calvet, S. Femandjian.
181. Individualization of angiotensin receptors in smooth muscle cell membranes. — *J. Physiol.*, 1973, vol. 232, p. 79P—80P. Auth.: M.-A. Devynck, S. Femandjian, P. Meyer, M.-G. Pernollet.
182. Investigation of the structure of angiotensin II using ^{13}C -NMR spectra. — *Eur. J. Biochem.*, 1972, vol. 29, p. 80—87. Auth.: S. Zimmer, W. Haar, W. Maurer, H. Ruterjans, S. Femandjian, P. Fromageot.
183. Ionic composition and ion exchange in vascular smooth muscle. Ed. by E. Bülbring, M. F. Shuba. N. Y., Raven Press, 1976, p. 19—39. Auth.: G. Siegel, H. Roedel, J. Nolte, H. W. Hofer, O. Bertsche.
184. Isogai Y., Némethy G., Scheraga H. A. Enkefalin: conformational analysis by means of empirical energy calculations. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, p. 414—418.
185. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Abbreviations and symbols for description of conformation of polypeptide chains. — *Pure Appl. Chem.*, 1974, vol. 40, p. 291—308.
186. Jorgensen E. C., Windridge G. C., Lee T. C. Angiotensin II analogs. VI. Synthesis and biological evaluation of simplified angiotensins. — *J. Med. Chem.*, 1970, vol. 13, p. 744—745.
187. Jorgensen E. C., Windridge G. C., Lee T. C. Angiotensin II analogs. V. [2-Glycine]-angiotensin II and related analogs. — *J. Med. Chem.*, 1971, vol. 14, p. 631—632.
188. Jorgensen E. C., Windridge G. C., Lee T. C. Angiotensin II analogs. X. Stereochemical factors in the 5 position influencing pressor activity. — *J. Med. Chem.*, 1973, vol. 16, p. 467—469.
189. Juliano L., Paiva A. Conformation of angiotensin II in aqueous solution. Titration of several peptide analogs and homologs. — *Biochemistry*, 1974, vol. 13, p. 2445—2450.
190. Kasai M., Changeux J. P. *In vitro* excitation of purified membrane fragments by cholinergic agonists. I. Pharmacological properties of the excitable membrane fragments. — *J. Membr. Biol.*, 1971, vol. 6, p. 1—23.
191. Keatinge W. R. Electrical and mechanical responses of vascular smooth muscle to vasodilator agents and vasoactive polypeptides. — *Circ. Res.*, 1966, vol. 18, p. 641—649.
192. Keynes R. D. The generation of electricity by fishes. — *Endeavour*, 1956, vol. 15, p. 215—222.

Список литературы

193. *Khairallah P. A., Moore A. J., Gurchinoff S.* Angiotensin receptor sites. — In: Central action of angiotensin and related hormones. Ed. by J. P. Buckley, C. M. Ferrario. N. Y.—Oxford—Toronto, Pergamon Press, 1977, p. 7—16.
194. *Khairallah P. A., Toth A., Bumpus F. M.* Analogs of angiotensin II. II. Mechanism of receptor interactions. — *J. Med. Chem.*, 1970, vol. 13, p. 181—184.
195. *Khosla M. C., Smeby R. R., Bumpus F. M.* Solid phase synthesis of [L-alanine³-L-isoleucine⁵]-angiotensin II. — *Biochemistry*, 1967, vol. 6, p. 754—756.
196. *Khosla M. C., Smeby R. R., Bumpus F. M.* Structure-activity relationship in angiotensin II analogs. — In: Angiotensin. Handbook of experimental pharmacology. New series. XXXVII. Ed. by I. H. Page, F. Bumpus. Berlin—N. Y., 1974, p. 126—161.
197. Kinetics of the reaction of renin with nine synthetic peptide substrates. — *J. Exp. Med.*, 1968, vol. 128, p. 13—34. Auth.: L. T. Skeggs, K. E. Lentz, J. R. Kahn, H. Hochstrasser.
198. *Koch-Waser J.* Nature of the inotropic action of angiotensin on ventricular myocardium. — *Circ. Res.*, 1965, vol. 16, p. 230—238.
199. *Kotelchuk D., Scheraga H. A., Walter R.* Conformational energy studies of oxytocin and its cyclic moiety. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, vol. 69, p. 3629—3633.
200. *Le Morvan P., Palaic D.* Characterization of the angiotensin receptors in guinea-pig aorta. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1975, vol. 195, p. 167—175.
201. *Levy W. B., Haycock J. W., Cotman C. W.* Membrane permeability and receptor function. — *J. Theor. Biol.*, 1976, vol. 60, p. 109—130.
202. *Lewis P. N., Momany F. A., Scheraga H. A.* Energy parameters in polypeptides. VI. Conformational energy analysis of the N-acetyl N-methyl amides of the twenty naturally occurring amino acids. — *Israel J. Chem.*, 1973, vol. 11, p. 121—152.
203. *Limas C. J., Chon J. N.* Alkaline phosphatase in vascular smooth muscle. — *Nature. New Biol.*, 1973, vol. 245, p. 53—55.
204. *Lin S. Y., Goodfriend T. L.* Angiotensin receptors. — *Am. J. Physiol.*, 1970, vol. 218, p. 1319—1328.
205. *Madison V., Schellman J.* Optical activity of polypeptides and proteins. — *Biopolymers*, 1972, vol. 11, p. 1041—1076.
206. *Marshall G. R., Bosshard H. E.* Angiotensin II: studies on the biologically active conformation. — *Circ. Res.*, 1972, vol. 31, Suppl. II, p. 143—150.
207. *Marshall G. R., Eilers N., Vine W.* Angiotensin II: a competitive inhibitor and analogs with restricted conformation. — In: Progress in peptide research, vol. 2. Ed. by S. Lande. Gordon and Breach, Sci. Publ., 1972, p. 15—18.
208. *Marshall G. R., Merrifield R. B.* Synthesis of angiotensins by the solid-phase method. — *Biochemistry*, 1965, vol. 4, p. 2394—2401.
209. *Marx J. L.* Hypertension: a complex disease with complex causes. — *Science*, 1976, vol. 194, p. 821—825.
210. Mechanism for the positive inotropic effect of angiotensin II on isolated cardiac muscle. — *Circ. Res.*, 1976, vol. 39, p. 178—183. Auth.: R. J. Freer, A. J. Pappano, M. J. Peach, K. T. Bing, M. J. McLean, S. Vogel, N. Sperelakis.

Список литературы

211. Beeler G. W., Reuter H. Membrane calcium current in ventricular myocardial fibers. — J. Physiol., 1970, vol. 207, p. 191—209.
212. Meyer P., Papadimitriou A., Worcel M. Possible existence of different types of angiotensin II receptors. — Brit. J. Pharmacol., 1970, vol. 40, p. P541—P542.
213. Mimran A., Hinrichs K., Hollenberg N. K. Characterization of smooth muscle receptors for angiotensin: studies with an antagonist. — Am. J. Physiol., 1974, vol. 226, p. 185—190.
214. Mironneau J. Excitation-contraction coupling in voltage clamped uterine smooth muscle. — J. Physiol., 1973, vol. 233, p. 127—141.
215. Molecular pharmacology, vol. 1. Ed. by E. J. Ariëns. N. Y. — London, Academic Press, 1964. 491 p.
216. Momany F. A. Conformational energy analysis of the molecule, luteinizing hormone-releasing hormone. 1. Native decapeptide. — J. Am. Chem. Soc., 1976, vol. 98, p. 2990—2996.
217. Momany F. A. Conformational energy analysis of the molecule, luteinizing hormone-releasing hormone. 2. Tetrapeptide and decapeptide analogues. — J. Am. Chem. Soc., 1976, vol. 98, p. 2996—3000.
218. Munday K. A., Parsons B. J., Poat J. A. The effect of angiotensin on cation transport by rat kidney cortex slices. — J. Physiol., 1971, vol. 213, p. 269—282.
219. Myotropic action of angiotensin and noradrenaline in strips of rabbit aortae. — Can. J. Physiol. Pharmacol., 1977, vol. 55, p. 1056—1069. Auth.: J. St.-Louis, D. Regoli, J. Barabe, W. K. Park.
220. Nakayama T., Nakajima T., Sokabe H. Comparative studies on angiotensins. 3. Structure of fowl angiotensin and its identification by DNS-method. — Chem. Pharm. Bull., 1973, vol. 21, p. 2085—2087.
221. Nakayama T., Nakajima T., Sokabe H. Comparative studies on angiotensins. 4. Structure of snake (*Elaphe climocophora*) angiotensin. — Chem. Pharm. Bull., 1977, vol. 25, p. 3255—3260.
222. Needleman P., Freer R. J., Marshall G. R. Angiotensin-receptor interaction: influence of pH on angiotensin inhibition by Phe⁴-Tyr⁸-angiotensin II in rat uterine smooth muscle. — Arch. int. pharmacodyn., 1972, vol. 200, p. 118—125.
223. Needleman P., Marshall G. R., Rievier J. Angiotensin II. Synthesis and biological activity of 6-(1-Me His) and 6-(3-Me His) analogs. — J. Med. Chem., 1973, vol. 16, p. 968—969.
224. New developments in our knowledge of the chemistry of renin. — Fed. Proc., 1977, vol. 36, p. 1755—1759. Auth.: L. T. Skeggs, M. Levin, K. E. Lentz, J. R. Kahn, F. E. Dorer.
225. NMR evidence against γ -turn and β -turn models of angiotensin II in aqueous solution. — Nature. New Biol., 1973, vol. 245, p. 125—127. Auth.: G. R. Marshall, E. H. Bosshard, W. H. Vine, J. D. Glickson.
226. Ohashi H., Nonomura Y., Ohga A. Effects of angiotensin, bradykinin and oxytocin on electrical and mechanical activities in the taenia coli of the guinea pig. — Jap. J. Pharmacol., 1967, vol. 17, p. 247—257.
227. Oparil S. Theoretical approaches to estimation of plasma renin activity:

Список литературы

- a review and some original observations. — Clin. Chem., 1976, vol. 22, p. 583—593.
228. *Oparil S., Haber E.* The renin-angiotensin system. — New Engl. J. Med., 1974, vol. 291, p. 389—400.
 229. *Oparil S., Haber E.* The renin-angiotensin system. — New Engl. J. Med., 1974, vol. 291, p. 446—457.
 230. *Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T.* Conformational states and biological activity of cyclic peptides. — Tetrahedron, 1975, vol. 31, p. 2177—2209.
 231. *Page I. H., Bumpus F. M.* Angiotensin. — Physiol. Rev., 1961, vol. 41, p. 331—390.
 232. *Paiva A. C. M., Paiva T. B.* The photo-oxydative inactivation of angiotensinamide. — Biochim. biophys. acta, 1961, vol. 48, p. 412—417.
 233. *Paiva T. B., Paiva A. C. M., Scheraga H. A.* The conformation of angiotensin II aqueous solution. — Biochemistry, 1963, vol. 2, p. 1327—1334.
 234. *Papadimitriou A., Worcel M.* Dose-response curves for angiotensin II and synthetic analogues in the three types of smooth muscle: existence of different forms of receptor sites for angiotensin II. — Brit. J. Pharmacol., 1974, vol. 50, p. 291—297.
 235. *Paruszewski R.* Synteza analogów Asp- β -amidu angiotensyny II. I. Analogi o zamienionym amino-kwasie w położeniu 5 łańcucha polipeptydowego. — Roczn. chem., 1973, t. 47, s. 735—747.
 236. *Paton W. D. M.* A theory of drug action based on the rate of drug-receptor combination. — Proc. Roy. Soc. Ser. B, 1961, vol. 154, p. 21—69.
 237. *Paton W. D. M., Perry W. L. M.* The relationship between depolarization and block in the cat's superior cervical ganglion. — J. Physiol., 1953, vol. 119, p. 43—57.
 238. *Paton W. D. M., Waud D. R.* A quantitative investigation of the relationship between rate of access of drug to receptor and the rate of onset or offset of action. — Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol., 1964, Bd. 248, S. 124—143.
 239. *Peach M. J.* Adrenal medula. — In: Angiotensin. Handbook of experimental pharmacology. New series. XXXVII. Ed. by I. H. Page, F. Bumpus. Berlin—N. Y., 1974, p. 400—404.
 240. *Peart W. S.* Renin-angiotensin system. — New Engl. J. Med., 1975, vol. 292, p. 302—306.
 241. Pharmacology of valyl⁵-(3-pyrazolyl)-L-alanyl⁶-angiotensin II. — J. Pharmacol. Exp. Ther., 1969, vol. 168, p. 295—302. Auth.: W. E. Hageman, K. Hofmann, R. J. Ertel, J. P. Buckley.
 242. *Piechocki G.* Theoretical plotting of the action potential curve *Characeae* cells. — Acta Soc. bot. polon., 1972, vol. 61, p. 315—320.
 243. Polypeptides. I. Synthesis and activity of angiotensin analogs (mostly heptapeptides) in which the arginine moiety is replaced by similar residues of varied structure and configuration. — Rech. trav. chim. Pays-Bas, 1964, vol. 83, p. 672—676. Auth.: E. Havinga, C. Schattenkerk, G. H. Visser, K. E. T. Kerling.

Список литературы

244. Ponnuswamy P. K., Warne P. K., Scheraga H. A. Role of medium-range interactions in proteins. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, vol. 70, p. 830—835.
245. Post-nephrectomy changes in adrenal angiotensin II receptors in the rat; influence of exogenous angiotensin and competitive inhibitor. — *Eur. J. Pharmacol.*, 1977, vol. 43, pp. 361—372. Auth.: M.-G. Pernollet, M.-A. Devynck, P. G. Mattheys, P. Meyer.
246. Preparation and properties of a calcium sensitive actomyosin from arteries. — *Am. J. Physiol.*, 1970, vol. 219, p. 1366—1378. Auth.: M. P. Sparrow, L. C. Maxwell, J. S. Ruegg, D. C. Bohr.
247. Preparation and properties of iodinated angiotensins. — *Biochem. Pharmacol.*, 1970, vol. 19, p. 651—662. Auth.: S. Y. Lin, H. Ellis, B. Weisblum, T. L. Goodfriend.
248. Printz M. P., Nemethy G., Bleich H. Proposed model for angiotensin II in aqueous solution and conclusions about receptor topography. — *Nature. New Biol.*, 1972, vol. 237, p. 135—140.
249. Printz M. P., Williams H. P., Craig L. C. Evidence for the presence of hydrogen-bonded secondary structure in angiotensin II in aqueous solution. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1972, vol. 69, p. 378—382.
250. Pullman B., Pullman A. Molecular orbital calculations on the conformation of amino acid residues of proteins. — *Adv. Prot. Chem.*, 1974, vol. 28, p. 347—394.
251. Purification and partial characterization of human angiotensin. — *Biochim. biophys. acta*, 1976, vol. 427, p. 208—217. Auth.: P. Eggena, C. L. Chu, J. D. Barrett, M. P. Sambri.
252. Purification, properties and kinetics of sheep and human renin substrates. — *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1975, vol. 53, p. 77—88. Auth.: S. L. Skinner, J. R. Dunn, J. Mazzetti, D. J. Campbell, N. H. Fidge.
253. Quantitative 250 MHz PMR study of hydrogen-deuterium exchange. Angiotensin II hormone in trifluoroethanol. — *Biochim. biophys. acta*, 1977, vol. 494, p. 293—300. Auth.: C. Thiéry, E. Nabadryk-Viala, S. Fermandjian, J. M. Thiéry.
254. Ralston E., De Coen J.-L. Folding of polypeptide chains induced by the amino acid side-chains. — *J. Mol. Biol.*, 1974, vol. 83, p. 393—420.
255. Ralston E., Somorjai R. L. Dielectric constant or dielectric function? — In: *Peptides: chemistry, structure, biology*. Ed. by R. Walter, J. Meienhofer. Ann Arbor, Ann Arbor Sci., 1975, p. 271—277.
256. Ramachandran G. N., Sasisekharan V. Conformation of polypeptides and proteins. — *Adv. Prot. Chem.*, 1968, vol. 23, p. 283—437.
257. Receptor binding of angiotensin II and antagonists. Correlation with aldosterone production by isolated canine adrenal glomerulosa cells. — *Circ. Res.*, 1976, vol. 38, Suppl. 2, p. 108—112. Auth.: J. Douglas, S. Saltman, P. Fredlund, T. Kondo, K. J. Catt.
258. Refinement of the angular dependence of the peptide vicinal NH-C α -H coupling constant. — *Tetrahedron*, 1973, vol. 28, p. 873—877. Auth.: V. F. Bystrov, V. T. Ivanov, S. L. Portnova, T. A. Balashova, Yu. A. Ovchinnikov.

Список литературы

259. Regoli D., Park W. K. The pressor and myotropic effects and the antagonistic properties of several analogs of angiotensin II. — *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1972, vol. 50, p. 99—112.
260. Regoli D., Park W. K., Rioux F. II. Pharmacology of angiotensin antagonists. — *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1973, vol. 51, p. 114—121.
261. Regoli D., Park W. K., Rioux F. Pharmacology of angiotensin and inhibitors. — *Acta physiol. latinoam.*, 1974, vol. 24, p. 525—528.
262. Regoli D., Park W. K., Rioux F. Pharmacology of angiotensin. — *Pharm. Rev.*, 1974, vol. 26, p. 69—123.
263. Regoli D., Rioux F., Park W. K. Dissociation constant of angiotensin II as determined by the use of an irreversible specific inhibitor (1-Sar-8-Leu-AT II). — *Rev. can. biol.*, 1972, vol. 31, p. 73—77.
264. Relation between alkaline phosphatase and Ca^{2+} -ATPase in calcium transport. — *Nature. New Biol.*, 1972, vol. 240, p. 126—127. Auth.: R. G. G. Russell, A. Monod, J.-P. Bonjour, H. Fleisch.
265. Requirements for angiotensin tachyphylaxis in smooth muscle. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1977, vol. 202, p. 294—300. Auth.: T. B. Paiva, M. E. Miyamoto, L. Juliano, A. C. M. Paiva.
266. Riniker B., Brunner H., Schwyzer R. β -Asp¹-Val⁵-Hypertensin II, ein Hypertensin-Analoge mit besonders hoher biologischer Aktivität. — *Angew. Chem.*, 1962, Bd. 74, S. 469.
267. Riniker B., Schwyzer R. Synthetische Analoge des Hypertensins. II. Arg(NO₂)-Val⁵-Hypertensin II-Asp¹- β -Amid und Val⁵-Hypertensin II-Asp¹- β -Phe⁸-Diamid. — *Helv. chim. acta*, 1961, vol. 44, p. 674—676.
268. Riniker B., Schwyzer R. Synthetische Analoge des Hypertensins. III. Gly¹-Val⁵-Hypertensin II, Orn²-Val⁵-Hypertensin II, Phe⁴-Val⁵-Hypertensin II und Derivat. — *Helv. chim. acta*, 1961, vol. 44, p. 677—684.
269. Riniker B., Schwyzer R. Synthetische Analoge des Hypertensins. IV. Synthese kettenhomologer Peptide. — *Helv. chim. acta*, 1961, vol. 44, p. 685—690.
270. Riniker B., Schwyzer R. Synthetische Analoge des Hypertensins. V. α -L, β -L, α -D- und β -D-Asp¹-Val⁵-Hypertensin II; desamino-Val⁵-Hypertensin II. — *Helv. chim. acta*, 1964, vol. 47, p. 2357—2374.
271. Riniker B., Schwyzer R. Synthetische Analoge des Hypertensins. VI. α -L-Asp(NH₂)¹-Aza- α -homo-Tyr⁴-Val⁵-Hypertensin II, und β -L-Asp¹-Aza- α' -homo-Tyr⁴-Val⁵-Hypertensin II. — *Helv. chim. acta*, 1964, vol. 47, p. 2375—2384.
272. Rioux F., Park W. K., Regoli D. Application of drug-receptor theories to angiotensin. — *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1973, vol. 51, p. 665—672.
273. Rioux F., Park W. K., Regoli D. Role of the C-terminal group for the biological activities of angiotensin. — *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1975, vol. 53, p. 383—391.
274. Rioux F., Regoli D., Park W. K. Competitive antagonists of angiotensin II on the isolated rat stomach strip. — *Rev. Can. Biol.*, 1971, vol. 30, p. 333—336.
275. Role of the N-terminal amino acid for the biological activities of angiotensin and inhibitory analogues. — *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1974, vol. 52, p. 39—49. Auth.: D. Regoli, F. Rioux, W. K. Park, C. Choi.

Список литературы

276. Schattenkerk C., Havinga E. Studies on polypeptides. IV. Synthesis and activities of some angiotensin-like peptides. — Rech. trav. chim. Pays-Bas, 1965, vol. 84, p. 653—658.
277. Scheraga H. A. Calculations of conformations of polypeptides. — Adv. Phys. Org. Chem., 1968, vol. 6, p. 103—183.
278. Schiller P. W. Study of adrenocorticotrophic hormone conformation by evaluation of intermolecular resonance energy transfer in Nε-dansyllysine²¹. ACTH-(1—24)-tetraicosipeptide. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972, vol. 69, p. 975—979.
279. Schiller P. W. Synthesis and solution conformation of [Trp¹, Val⁵]-angiotensin II. — Can. J. Biochem., 1977, vol. 55, p. 75—82.
280. Schlieper P. Effect of angiotensin II on artificial lipid membrane. — Biochim. biophys. acta, 1977, vol. 464, p. 448—452.
281. Schröder E. Synthese von Val⁵-Angiotensin II-Asp¹-β-Amid, von Lys²-Val⁵- und von Val²-Val⁵-Angiotensin II-Asp¹-β-Amid. — Justus Liebigs Ann. Chem., 1964, Bd. 680, S. 132—141.
282. Schröder E. Synthese von Tyr³-Val⁴-Val⁵-, von Phe⁶-Val⁵- und von Phe⁴-Tyr⁸-Val⁵-Angiotensin II-Asp¹-β-Amid. — Justus Liebigs Ann. Chem., 1964, Bd. 680, S. 142—154.
283. Schröder E. Synthese von d-Asp¹-, Glu¹-, Glu(NH₂)¹- und Pyroglu¹-Val⁵-Angiotensin II. — Justus Liebigs Ann. Chem., 1966, Bd. 691, S. 232—239.
284. Schröder E., Hempel R. Synthese von Lys⁶-Val⁵-, von Tyr³-Val⁵-, von Tyr(Me)⁴-Val⁵- und von Tyr⁸-Val⁵-Angiotensin II-Asp¹-β-Amid. — Justus Liebigs Ann. Chem., 1965, Bd. 684, S. 243—251.
285. Schwyzer R. Synthetische Analoge des Hypertensins. I. Einleitung. — Helv. chim. acta, 1961, vol. 44, p. 667—674.
286. Schwyzer R., Turrian H. Chemistry and pharmacology of angiotensin. — In: Vitamins and hormones, vol. 18. Ed. by R. S. Harris, K. V. Thimann. N. Y., 1960, p. 237—288.
287. Seu J. H., Smeby R. R., Bumpus F. M. Synthesis of isoleucyl⁵-alanyl⁷-angiotensin II. — J. Am. Chem. Soc., 1962, vol. 84, p. 3883—3887.
288. Seu J. H., Smeby R. R., Bumpus F. M. Synthesis of alanyl⁴-isoleucyl⁵-angiotensin II. — J. Am. Chem. Soc., 1962, vol. 84, p. 4948—4950.
289. Severs W. B., Summy-Long J. The role of angiotensin in thirst. — Life Sci., 1975, vol. 17, p. 1513—1526.
290. Shibata S., Carrier O., Frankenheim J. Effect of chlorpromazine, dibenzamine and phenoxybenzamine on the contractile response of taenia coli to potassium, acetylcholine, angiotensin and barium. — J. Pharmacol. Exp. Ther., 1968, vol. 160, p. 106—111.
291. Sivanandaian K. M., Smeby R. R., Bumpus F. M. Synthesis of isoleucine⁵-tyrosine⁸-angiotensin II and isoleucine⁵-hydroxyproline⁷-angiotensin II. — Biochemistry, 1966, vol. 5, p. 1224—1229.
292. Sogn J. A., Gibbons W. A., Randall E. W. Study of nitrogen-15-labelled amino acids and peptides by NMR spectroscopy. — Biochemistry, 1973, vol. 12, p. 2100—2105.
293. Solid-phase synthesis of [Arg⁶]-, [His⁴, Tyr⁶]-, and [Ile⁸]-angiotensin II. —

J. Med. Chem. 1972, vol. 15, p. 1184—1185. Auth.
 R. R. Smeby, F. M. Bumpus
 Solid-phase synthesis of [4-ph
 8-isoleucine]- and [4-ph
 tagonists of the par
 P. 1184—1185. Auth.
 F. M. Bumpus.
 Solubilization of ang
 Nature, 1974, vol. 24
 P. Meyer, S. Ferman
 Solvent exposure of
 solvent saturation m
 T. P. Pitner, J. D. G
 Some concepts on
 receptor level. —
 Amsterdam, North
 p. 437—449. Auth.
 A. P. Pavar, O. S
 Somlyo A. P., Son
 of maximal vascu
 Symp. Physiol. P
 ger, 1971, p. 216
 Specific angioten
 nucleus cells. —
 B. H. Marks, J
 Structure and
 aza-α'-homoan
 Univ. Bruxell
 nasyeva, J. F
 N. Makarova
 Structure-fur
 α-MSH, bra
 mical inform
 L. Vassileva
 P. J. Roma
 V. E. Klush
 Studies on
 p. 684—6
 E. Having
 Studies c
 histidine
 J. Am.
 R. Andre
 Studies
 [Ile³]-an
 butions
 1971, v
 K. E. T

Список литературы

- J. Med. Chem., 1972, vol. 15, p. 627—629. Auth.: M. C. Khosla, S. Kumar, R. R. Smeby, F. M. Bumpus.
294. Solid-phase synthesis of [3-proline, 8-isoleucine]-, [1-sarcosine, 3-proline, 8-isoleucine]- and [4-phenylalanine, 8-isoleucine] angiotensin II as the antagonists of the parent hormone. — J. Med. Chem., 1973, vol. 16, p. 1184—1185. Auth.: M. C. Khosla, M. M. Hall, R. R. Smeby, F. M. Bumpus.
 295. Solubilization of angiotensin II receptors in rabbit aortal membranes. — Nature, 1974, vol. 249, p. 67—69. Auth.: M.-A. Devynck, M.-G. Pernollet, P. Meyer, S. Fermandjian, P. Fromageot, F. M. Bumpus.
 296. Solvent exposure of specific nuclei of angiotensin II determined by NMR solvent saturation method. — Nature, 1974, vol. 250, p. 582—584. Auth.: T. P. Pitner, J. D. Glickson, J. Dadok, G. R. Marshall.
 297. Some concepts on the molecular mechanism of peptide hormone action at receptor level. — In: Peptides 1972. Ed. by H. Hanson, H.-D. Jakubke. Amsterdam, North-Holland Publ. Co., N. Y., Elsevier Publ. Co., 1973, p. 437—449. Auth.: G. I. Chipens, Z. P. Auna, V. E. Klusha, A. J. Krikis, A. P. Pavar, O. S. Papsuevich, P. Ya. Romanovski, R. E. Vegner.
 298. *Somlyo A. P., Somlyo A. V.* Electrophysiological correlates in the inequality of maximal vascular smooth muscle contraction, elicited by drug. — Proc. Symp. Physiol. Pharmacol. Vascular Neuroeffector Systems. Basel, S. Karger, 1971, p. 216—228.
 299. Specific angiotensin II receptors in organ-cultured canine supra-optic nucleus cells. — Life Sci., 1974, vol. 14, p. 1337—1344. Auth.: K. K. Sakai, B. H. Marks, J. George, A. Koestner.
 300. Structure and biological activity of angiotensin analogues comprising aza- α' -homoamino-acids. — In: Peptides 1976. Ed. by A. Loffet. Bruxelles, Univ. Bruxelles, 1976, p. 353—360. Auth.: G. Chipens, J. Ancan, G. Afanasyeva, J. Balodis, J. Indulen, V. Klusha, V. Kudryashova, E. Lepinsh, N. Makarova, N. Mishlyakova.
 301. Structure-function organization and principles of information coding in ACTH, α -MSH, bradykinin and wasp kinin molecules. — In: Physical and chemical information transfer in regulation of reproduction and ageing. Ed. by L. Vassileva-Popova. Varna, 1977, p. 13. Auth.: G. I. Chipens, A. J. Krikis, P. J. Romanovski, G. V. Nikiforovich, F. K. Mutulis, E. A. Porunkovich, V. E. Klusha.
 302. Studies on polypeptides. — Rech. trav. chim. Pays-Bas, 1964, vol. 83, p. 684—688. Auth.: G. N. Visser, C. Schattenkerk, K. E. T. Kerling, E. Havinga.
 303. Studies on polypeptides. XXXIX. Elimination of the imidazole portion of histidine as an essential site for biological function of angiotensin. — J. Am. Chem. Soc., 1968, vol. 90, p. 1654—1655. Auth.: K. Hofmann, R. Andreatta, J. P. Buckley, W. E. Hageman, A. P. Shapiro.
 304. Studies on polypeptides. Part XII. Myotropic activities of some des-Asp¹-[Ile⁵]angiotensin analogues. Data and a working hypothesis on the contributions of the arginine residue to activity. — Rech. trav. chim. Pays-Bas, 1971, vol. 90, p. 301—303. Auth.: J. S. De Graaf, A. C. A. Jansen, K. E. T. Kerling, C. Schattenkerk, E. Havinga.

Список литературы

305. Synthese hochwirksamer Dekapeptide mit der Aminosäuresequenz des Val⁵-Hypertensins. I. — *Helv. chim. acta*, 1958, vol. 41, p. 1273—1286. Auth.: R. Schwyzer, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker, W. Rittel, H. Zuber.
306. Synthesis, biological activity and ¹⁹F-NMR spectra of AII analogs, containing fluorine. — *Biochemistry*, 1973, vol. 12, p. 1630—1637. Auth.: W. H. Vine, D. A. Brueckner, P. Needleman, G. R. Marshall.
307. Synthesis of [1-isoleucine-, 3-proline- and 5-alanine]-angiotensins II. — *Biochemistry*, 1968, vol. 7, p. 3417—3421. Auth.: M. C. Khosla, N. C. Chaturvedi, R. R. Smeby, F. M. Bumpus.
308. Synthesis of peptides with the solid phase method. II. Octapeptide analogues of angiotensin II. — *Can. J. Biochem.*, 1974, vol. 52, p. 113—119. Auth.: W. K. Park, C. Choi, F. Rioux, D. Regoli.
309. Synthesis of some analogs of angiotensin II as specific antagonists of the parent hormone. — *J. Med. Chem.*, 1972, vol. 15, p. 792—795. Auth.: M. C. Khosla, R. A. Leese, W. L. Maloy, A. T. Ferreira, R. R. Smeby, F. M. Bumpus.
310. The amino acid sequence of hypertensin II. — *J. Exp. Med.*, 1956, vol. 104, p. 193—197. Auth.: L. T. Skeggs, K. E. Lentz, J. R. Kahn, N. P. Shumway, K. R. Woods.
311. The non-electrogenic nature of angiotensin-stimulated sodium transport. — *J. Endocrinol.*, 1974, vol. 63, p. P39—P40. Auth.: T. E. Bolton, B. J. Parsons, K. A. Munday, B. G. York.
312. The pH dependence of the conformation of angiotensin peptides by NMR: *cis-trans* isomerism of proline 7. — *Biochemistry*, 1976, vol. 15, p. 2303—2309. Auth.: R. E. Galardy, H. E. Bleich, P. Ziegler, L. C. Craig.
313. The regulation of pressure by the renin-angiotensin system. — *Fed. Proc.*, 1973, vol. 32, p. 380. Auth.: A. I. Samuels, E. D. Miller, C. S. Fray, E. Haber, A. C. Barger.
314. The relationship of structure to pressor and oxytocic actions of isoleucine⁵ angiotensin octapeptide and various analogues. — *Biochim. biophys. acta*, 1961, vol. 46, p. 38—44. Auth.: F. M. Bumpus, P. A. Khairallah, K. Arakawa, I. H. Page, R. R. Smeby.
315. The solution conformation of bradykinin. — In: *Peptides: chemistry, structure, biology*. Ed. by R. Walter, J. Meienhofer. Ann Arbor, Ann Arbor Sci., 1975, p. 151—157. Auth.: V. T. Ivanov, M. P. Filatova, Z. Reissman, T. O. Reutova, E. S. Efremov, V. S. Pashkov, S. G. Galaktionov, G. L. Grigoryan, Yu. A. Ovchinnikov.
316. Three-dimensional structure of angiotensin II. — In: *Peptides-1976*. Ed. by A. Loffet. Bruxelles, Univ. Bruxelles, 1976, p. 617—624. Auth.: S. G. Galaktionov, G. V. Nikiforovich, M. D. Shenderovich, G. I. Chipens, R. E. Vegner.
317. pH titration effects on the CD spectra of angiotensin II, truncated peptides and other analogues: aromatic region. — *FEBS Lett.*, 1975, vol. 56, p. 366—369. Auth.: K. Lintner, S. Fermandjian, P. Fromageot, M. C. Khosla, R. R. Smeby, F. M. Bumpus.
318. Tobian L. Renin release and its role in renal function and the control of salt balance and arterial pressure. — *Fed. Proc.*, 1967, vol. 26, p. 48—54.
319. Tonelli A. E. The effect of isolated N-methylated residues on the conforma-

Список литературы

- tional characteristics of polypeptides. — *Biopolymers*, 1976, vol. 15, p. 1615—1622.
320. Topical differences in excitation and contraction between guinea pig stomach muscle. — In: *Physiology of smooth muscle*. Ed. by E. Bülbring, M. F. Shuba. N. Y., Raven Press, 1976, p. 185—196. Auth.: H. Kuriyama, T. Osa, Y. Ito, H. Suzuki, K. Mishima.
 321. *Türker R. K., Page I. H., Bumpus F. M.* Antagonists of angiotensin II. — In: *Angiotensin. Handbook of experimental pharmacology. New series. XXXVII*. Ed. by I. H. Page, F. Bumpus. Berlin—N. Y., 1974, p. 162—169.
 322. *Türker R. K., Page I. H., Khairallah P. A.* Angiotensin alternation of sodium fluxes in smooth muscle. — *Arch. int. pharmacodyn.*, 1967, vol. 165, p. 394—404.
 323. *Urry D. W., Walter R.* Proposed conformation of oxytocin in solution. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, vol. 68, p. 956—958.
 324. Use of angiotensin II antagonists in experimental hypertension. — *Circ. Res.*, 1973, vol. 32, Suppl. 1, p. 150—158. Auth.: F. M. Bumpus, S. Seu, R. R. Smeby, C. Sweet, C. M. Ferrario, M. C. Khosla.
 325. Val-hypertensin I and II. — *Chimia*, 1958, vol. 12, p. 91. Auth.: R. Schwyzer, B. Riniker, B. Iselin, W. Rittel, H. Kappeler, H. Zuber.
 326. *Villamil M. F., Nachev P., Kleeman C. R.* Effect of prolonged infusion of angiotensin II on ionic composition of the arterial wall. — *Am. J. Physiol.*, 1970, vol. 218, p. 1281—1286.
 327. *Van Rossum J. M.* Cumulative dose-response curves. — *Arch. int. pharmacodyn.*, 1963, vol. 143, p. 299—330.
 328. Variations in number of uterine angiotensin receptors following changes in plasma angiotensin levels. — *Eur. J. Pharmacol.*, 1976, vol. 40, p. 27—37. Auth.: M.-A. Devynck, B. Rouzaire-Dubois, E. Chevillotte, P. Mayer.
 329. *Walter R., Smith J. C. P., Deslauriers R.* The conformation of oxytocin in dimethylsulfoxide as revealed by carbon-13 spin-lattice relaxation times. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1974, vol. 58, p. 216—221.
 330. *Weinkam R. J., Jorgensen E. C.* Angiotensin II analogs. VIII. The use of free radical containing peptides to indicate the conformation of the carboxyl terminal region of angiotensin II. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, vol. 93, p. 7033—7038.
 331. *Wilbur R., Fernholz E. R., Wilson C. T.* Kinetic models of the drug-receptor interaction. — *J. Theor. Biol.*, 1975, vol. 52, p. 335—341.
 332. *Williams G. H., Hollenberg N. K., Braley L. M.* Influence of sodium intake on vascular and adrenal angiotensin II receptors. — *Endocrinology*, 1976, vol. 98, p. 1343—1350.
 333. *Wright W. B.* The crystal structure of glutathione. — *Acta crystallogr.*, 1958, vol. 11, p. 632—642.

Станислав Геннадьевич
ГАЛАКТИОНОВ

Григорий Валерьянович
НИКИФОРОВИЧ

Гунар Игнатьевич
ЧИПЕНС

Марк Давидович
ШЕНДЕРОВИЧ

АНГИОТЕНЗИН

Молекулярные
механизмы действия

Редактор В. Парамонова

Художник В. Озеров

Художественный редактор Э. Бузова

Технический редактор Э. Поча

Корректор М. Стариченкова

ИБ № 463

Сдано в набор 06.12.78. Подписано в печать 17.05.79. ЯТ 04165. Формат 60×84/16. Бумага типогр. № 1. Гарнитура литературная. Высокая печать. 11,5 физ. печ. л.; 10,70 усл. печ. л.; 10,55 уч.-изд. л. Тираж 1000 экз. Заказ № 3317. Цена 1 р. 20 к. Издательство «Зинатне», 226018 Рига, ул. Тургенева, 19. Отпечатано в типографии «Циня» Государственного комитета Латвийской ССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли, 226011. Рига, ул. Блауманя, 38/40.

1 р. 20 к.



ALL
THE
NO
TH
CO
NT
IN

ATHENA

ATHFNO

